



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

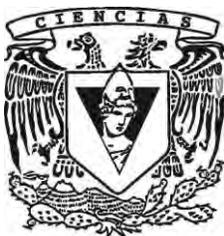
“Generación de proteínas híbridas de aroE y ydiB
de *E. coli*, mediante el método independiente de
homología ITCHY”

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:

MARIANA BUITRÓN CELORIO



Director de Tesis:
DR. LORENZO SEGOVIA FORCELLA

2016



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.

1. DATOS DEL ALUMNO

Buitrón
Celorio
Mariana
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
40105238-9

2. DATOS DEL TUTOR

Dr.
Lorenzo Patrick
Segovia
Forcella

3. DATOS DEL SINODAL 1

Dr.
Luis Felipe
Jiménez
García

4. DATOS DEL SINODAL 2

Dr.
Jorge Antonio
García
Álvarez

5. DATOS DEL SINODAL 3

Dra.
Laura
Kawasaki
Watanabe

6. DATOS DEL SINODAL 4

Dr.
Víctor Manuel
Valdés
López

7. DATOS DEL TRABAJO ESCRITO

“Generación de proteínas híbridas de aroE y ydiB de E. coli,
mediante el método independiente de homología, ITCHY”.
88 p
2016

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado a todas aquellas personas que nunca dejaron de creer en mí y a todas las que de alguna u otra manera, han contribuido a quien ahora soy.

A mi mamá, por todas las desveladas que sufrió conmigo durante todos y cada uno de mis años de estudiante. Por todas las reuniones, compromisos y días especiales que no pude estar a su lado; que tuvimos que sacrificar. Por su amor y apoyo incondicional, por ser mi bálsamo en los fracasos, por impulsarme a seguir pese a todo y compartir la alegría y la satisfacción en el éxito. Por mostrarme y compartirme la magia de la música y alentarme a nunca dejar de ser parte de ella. Por siempre recordarme que aún existe la bondad humana, la inocencia, la fe y mantener la esperanza viva de un mundo mejor aun cuando todo parezca derrumbarse. Por instruirme siempre con el ejemplo sobre el amor al prójimo y a la Naturaleza, por enseñarme a descubrir el asombro, maravillarme y respetar todas las formas de vida. Por luchar por su vida para seguir a mi lado. Por su sacrificio de madre y ser la mejor, para mí.

A mi papá, por todas esas horas de tortura-estudio que me dedicó durante la primaria y secundaria para conservar las mentadas becas, y que no entendí hasta años después. Por nunca permitir que me faltara algún material para mi educación y siempre impulsarme a ser una buena estudiante y una mujer independiente. Por inculcarme el amor a los libros, a la ciencia y al arte, y mostrarme así la importancia y el placer del conocimiento. Por ser mi vocero informativo en política nacional e internacional y mi principal motivador deportivo. Por siempre tener una respuesta y opinión crítica para casi cualquier pregunta o tema. Por enseñarme a siempre dudar de todo, a analizarlo todo e investigarlo todo: por enseñarme a pensar. Por, finalmente, comprender que la biología es mi verdadera vocación. Por ser mi papá, mi peor y mi mejor crítico, el mejor que pudo ser y el mejor que pude tener.

A la memoria de mi abuelita, mi segunda madre, por su amor y entrega incondicional, por siempre guiarme en el camino del desarrollo personal y conminarme a ser una mejor hija, nieta, estudiante, músico, amiga y mujer. Por cuidarme, procurarme y siempre ver por mí. Por todas las valiosas experiencias de vida que en complicidad, compartió conmigo, enseñándome el poder del amor, la esperanza, el perdón y la fe. Por todos los sabios consejos y las profundas lecciones de vida que me regaló aún en sus últimos días. Porque no hay día que no la extrañe.

A Arumita, por ser el gatillo que desató y puso en marcha la maquinaria interior.

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

Quiero agradecer a la UNAM y a la Facultad de Ciencias por haberme brindado la oportunidad de formarme como profesional, crecer como persona y abrir mi visión a toda una gama de posibilidades, así como a todos aquellos profesores que me marcaron durante el transcurso de mis estudios. De igual manera, me siento en profunda deuda con el Instituto de Biotecnología por abrirme el espacio como tesista y con ello, a un mundo nuevo; en particular, con el Dr. Lorenzo Segovia por permitirme formar parte de su equipo de trabajo, exigirme siempre lo mejor de mí y alimentar mi gusto por la investigación. También, y como parte de estos agradecimientos, es mi deseo reconocer los esfuerzos realizados por la UNAM y la administración del IBT, así como a los investigadores partícipes del Taller de Biomoléculas, entre ellos mi tutor y la Dra. Joseph, quienes en conjunto, hicieron posible el otorgamiento de becas de apoyo a la docencia a los estudiantes provenientes del taller durante su estancia en el IBT; con la que fui beneficiada.

Debo una particular y muy especial mención al Dr. Luis Felipe Jiménez, un humanista fuera de serie, a quien tuve la fortuna de conocer y tener como maestro, sinodal y coordinador. Es el ejemplo más claro y consistente de excelencia académica, calidez humana, sencillez y humildad que he tenido. Siempre dispuesto a abrir un espacio dentro de su imposible agenda para recibirme, escuchar mis penas u ofrecerme algún brillante consejo. Siempre estaré infinitamente agradecida por haberme convencido de continuar con el proyecto, por motivarme a seguir adelante pese a las adversidades y ofrecerme toda una gama de posibilidades para salir avante con la titulación. Ha sido un honor contar con su apoyo incondicional y amistad.

Al Dr. Jorge García, una gran persona, un gran investigador y un gran amigo que afrontó conmigo los peores escenarios y nunca vaciló en extenderme su mano ni “adoptarme” en su grupo de trabajo durante las últimas etapas de los preparativos y la presentación del examen profesional. Sus agudas observaciones, las recomendaciones durante los seminarios y sus finas atenciones, me permitieron sacar el mayor provecho de lo que ya había dado por perdido.

A la Dra. Laura Kawasaki, mi muy estimada maestra de Biotecnología, quien con sus enseñanzas marcó el rumbo de mi vida dentro de la Biología y me mostró la belleza de la Ingeniería Genética. Agradezco también por los valiosos consejos y comentarios durante la corrección de la tesis, y particularmente por la paciencia de años de espera, que en total humanismo y sincera comprensión, tuvo para conmigo cuando las dificultades no me permitían continuar con el proceso de titulación.

Al Dr. Víctor Valdés, por sus acertadas y prácticas correcciones durante la revisión de la tesis. Gracias por compartir sus opiniones, sugerencias e interesantes puntos de vista.

De forma muy especial, deseo también hacer un reconocimiento al Dr. Joel Osuna, quien durante toda mi estancia en el IBT, siempre estuvo dispuesto a compartirme generosamente y con paciencia infinita, su profundo conocimiento. Pese a que las circunstancias de vida no le permitan ahora recordar lo mucho que hizo por mí, no puedo más que sentirme privilegiada por haber tenido la oportunidad de ser guiada y haber aprendido tanto de él; un excelente mentor, una gran persona, y para fortuna mía, un amigo. Uno al que definitivamente yo nunca olvidaré. Todos esos momentos y enseñanzas, me los llevo en el corazón.

A la Dra. Patricia Joseph, por su apoyo constante, por transmitir de manera tan particular el amor a la investigación y por ser la pionera del Taller de Biomoléculas, permitiendo así la introducción de los estudiantes de Biología de la Facultad de Ciencias, a la investigación de primer nivel en el país. Gracias por esta gran oportunidad.

Al Dr. Paul Gaytán, quien sin conocerme y en un acto de confianza y generosidad, me permitió desempeñarme durante un periodo de mi estancia en el IBT, como “técnica de laboratorio” en su proyecto, cuyos apoyos económicos facilitaron mi permanencia en la institución.

Al Dr. Marc Ostermeier, a quien le agradezco enormemente su valiosa y pronta aportación sobre un tema puntual del protocolo ITCHY, que me permitió alcanzar un mayor entendimiento sobre el mismo.

A Humberto Flores del laboratorio del Dr. Xavier Soberón, por su imprescindible y acertado aporte de conocimientos, y a todos aquellos que me guiaron y/o donaron materiales durante la realización de la tesis.

A la Mtra. María de Jesús Vázquez y el Dr. Luis Medrano, por depositar su confianza en mí y abrirme las puertas en su grupo de investigación; por ofrecerme una opción. Por sorprenderme con su gran generosidad y empatía, y así, mostrarme una de las facetas más lindas de la ciencia con humanidad.

A los técnicos del laboratorio, siempre amables, sonrientes y solidarios.

A mis compañeros del laboratorio, que me enriquecieron con sus ideas y experiencia.

A todo el personal de secuenciación, síntesis de oligonucleótidos y cómputo.

A todo aquel cuya crítica u opinión resultaron valiosas para el proyecto y que no haya mencionado.

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
ANTECEDENTES	3
Evolución de proteínas.....	3
Recombinación de ADN	4
Métodos de recombinación <i>in vitro</i>	5
MODELO DE ESTUDIO	8
Vía del Shikimato.....	8
Shikimato Deshidrogenasas	9
AroE	9
YdiB	11
Plegamiento Rossmann	12
CAT	13
HIPÓTESIS	15
OBJETIVO GENERAL	15
OBJETIVOS PARTICULARES	15
MATERIALES Y MÉTODOS	16
Cultivos celulares	16
Biología molecular	16
Electroforesis.....	16
Electroporación	17
Amplificación, extracción y purificación de ADN	17
Digestión y ligación de ADN.....	18
Enzimas y buffers.....	18
Oligonucleótidos	18
Concentración Mínima Inhibitoria (MIC).....	19
Programas de análisis.....	19
Diseño y generación de las construcciones	20
Diseño de oligonucleótidos	23
Construcción de pT4-aroE-l-CAT.....	24
Construcción de pT4-aroE-CAT	25

Construcción de pT4-CAT (control).....	25
Diagrama 1: Construcción de vectores a partir de pT4-cons-CAT	27
MIC de las construcciones: Planeación y elaboración.....	28
ITCHY: Requisitos y proyecciones.....	29
Modificación de pT4-aroE-CAT	32
Construcción de pBSSK-ydiB	33
ITCHY: Obtención de librerías truncadas.....	36
Diagrama 2: Construcción de vectores pre-ITCHY	38
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	39
Importancia de la secuencia de unión para el reportero de plegamiento	39
MIC de las construcciones	42
Construcción de quimeras con el método ITCHY	43
Primera secuenciación de vectores ITCHY	52
Segunda secuenciación de vectores ITCHY	59
Alineamientos SeaView	62
Secuencia de <i>aroE</i> en quimera ITB-116	64
Secuencia de <i>ydiB</i> en quimera ITB-116.....	64
Mapa circular de vector ITCHY.....	65
Mapa circular de quimera ITB-116.....	65
MIC de quimeras ITCHY	66
CONCLUSIONES.....	77
PERSPECTIVAS	78
ANEXO.....	79
Alineamiento MAFFT.....	79
Tabla de Oligonucleótidos	80
Tabla de Plásmidos.....	81
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84
APÉNDICE	87

ABREVIATURAS

aa: Aminoácido

AMP: Ampicilina

AroE: Shikimato deshidrogenasa

aroE: Gen shikimato deshidrogenasa

CAT: Cloranfenicol acetyl transferasa

Cm: Cloranfenicol

CMI: Concentración mínima inhibitoria (MIC)

DNA: Ácido desoxirribonucleico (DNA)

dNTPs: dATP, dCTP, dGTP, dTTP

IPTG: Isopropil β -D tiogalactósido.

ITCHY: Incremental Truncation for the Creation of Hybrid Enzymes

kb: Kilobase

kDa: Kilo Daltones

Km: Kanamicina

LB: Medio de cultivo Luria-Bertani

MCS: Sitio de clonación múltiple.

NAD (H): Nicotinamida adenina dinucleótido

NADP (H): Nicotinamida adenina dinucleótido fostafo

N. D: No Distinguibles.

N.O: No Observables

nt: Nucleótidos

OD: Optical Density / Densidades Ópticas

ORF: Open Reading Frame / Marco de Lectura Abierto

pb: Pares de bases

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*)

PRAI: Fosforibosil Antranilato Isomerasa

RMSD: Root Mean Square Deviation (índice de divergencia estructural).

RNA: Ácido ribonucleico (ARN)

SDH: Familia Shikimato deshidrogenasa

SOC: Medio de crecimiento óptimo

TAE: Tris-Acetato-EDTA

Tc: Tetraciclina

UFC: Unidades formadoras de colonias

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Oligonucleótidos para construir pT4-aroE-l-CAT y pT4-aroE-CAT	23
Cuadro 2. Oligonucleótido para construir pT4-CAT.....	26
Cuadro 3. Oligonucleótidos para insertar KpnI en pT4-aroE-CAT	32
Cuadro 4. Oligonucleótido pT4CATRev para secuenciar final de <i>cat</i>	33
Cuadro 5. Oligonucleótidos SacIydiB y EPKydiB(R) para amplificar <i>ydiB</i>	33

ÍNDICE DE DIAGRAMAS

Diagrama 1. Construcción de vectores a partir de pT4-cons-CAT 27

Diagrama 2. Construcción de vectores pre-ITCHY 38

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estrategias de recombinación (Barajeo de ADN e ITCHY)	6
Figura 2. Técnica SCRATCHY	7
Figura 3. Vía del Shikimato	8
Figura 4. Reacción de la Shikimato Deshidrogenasa	9
Figura 5. Secuencia de aminoácidos de AroE	10
Figura 6. Estructura de la Shikimato Deshidrogenasa	10
Figura 7. Secuencia de aminoácidos de YdiB	11
Figura 8. Sobreposición estructural de AroE y YdiB.....	12
Figura 9. Topología de un plegamiento Rossmann.....	13
Figura 10. Secuencia del gen <i>aroE</i>	20
Figura 11. Secuencia del gen <i>ydiB</i>	21
Figura 12. Secuencia del gen <i>cat</i>	21
Figura 13. Mapa circular de pT4-consenso-CAT	22
Figura 14. Mapa circular de pBSSK-	22
Figura 15. Representación lineal de ITCHY sobre pT4-aroE-CAT	30
Figura 16. Representación lineal de ITCHY sobre pBSSK-ydiB	31
Figura 17. Representación lineal del vector pBSSK-ydiB/aroE-CAT	31
Figura 18. Mapa circular de pT4-aroE-l-CAT	39
Figura 19. Mapa circular de pT4-aroE-CAT	40
Figura 20. Mapa circular de pT4-CAT	40
Figura 21. MIC de construcciones en LB	42

Figura 22. MIC de construcciones en Km	42
Figura 23. MIC de construcciones en Cm	42
Figura 24. MIC de construcciones en Km y Cm.....	42
Figura 25. Mapa circular de pT4-aroE-CATk.....	44
Figura 26. Mapa circular de pBSSK-ydiB	44
Figura 27. Marcador molecular	49
Figura 28. PCR 1: Clonas ITCHY	50
Figura 29. PCR 2: Clonas ITCHY	50
Figura 30. PCR 3: Clonas ITCHY	50
Figura 31. PCR 4: Clonas ITCHY	51
Figura 32. PCR CONTROLES	51
Figura 33. Doble selección de clonas ITCHY	53
Figura 34. PCR 1 ITCHY: Grupo rojo	57
Figura 35. PCR 1 ITCHY: Grupo azul y controles	57
Figura 36. PCR 2 ITCHY: Grupo rojo	58
Figura 37. PCR 2 ITCHY: Grupo azul y controles	58
Figura 38. Alineamiento forward de ITB-116 con <i>aroE</i> -CAT	62
Figura 39. Alineamiento reverse de ITB-116 con pBSSK-ydiB	63
Figura 40. Alineamiento reverse de ITB-116 con <i>aroE</i> -CAT	63
Figura 41. Secuencia de <i>aroE</i> en quimera ITB-116.....	64
Figura 42. Secuencia de <i>ydiB</i> en quimera ITB-116.....	64
Figura 43. Mapa circular de pBSSK-ydiB/aroECAT	65
Figura 44. Mapa circular de ITB-116	65

Figura 45. Crecimiento de quimeras en LB.....	67
Figura 46. Crecimiento de quimeras en Amp.....	67
Figura 47. MIC de quimeras en Cm: Grupo Rojo	68
Figura 48. MIC de quimeras en Cm: Grupo Azul.....	69
Figura 49. MIC de quimeras en Amp y Cm: Grupo Rojo	70
Figura 50. MIC de quimeras en Amp y Cm: Grupo Azul.....	71
Figura 51. Alineamiento MAFFT de secuencias de AroE y YdiB	79

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. MIC de construcciones: Antibióticos y sus concentraciones	28
Tabla 2. Construcciones ITCHY y controles	47
Tabla 3. Crecimiento de colonias ITCHY y controles (Primera vuelta)	47
Tabla 4. Clonas ITCHY: Crecimiento en XL1Blue y MC1061	54
Tabla 5. Crecimiento de colonias con controles ITCHY (Segunda vuelta)	55
Tabla 6. Relación de pb digeridas en genes de quimeras ITCHY	60
Tabla 7. MIC de ITCHY: Antibióticos y sus concentraciones.....	66
Tabla 8. MICs y crecimientos de quimeras ITCHY	72
Tabla 9. Tabla de oligonucleótidos	80
Tabla 10. Tabla de plásmidos	81

RESUMEN

El presente trabajo, constó de dos objetivos principales. En el primero se analizó la importancia del linker (conector) en el reportaje de expresión del gen *aroE* por la proteína CAT y en el segundo, se generaron proteínas híbridas a partir de dos secuencias independientes de homología *aroE* y *ydiB* mediante el método ITCHY.

En la primera parte, se generaron tres construcciones a partir del plásmido pT4: pT4-*aroE*-CAT, con el gen *aroE* fusionado directamente a la secuencia de CAT; pT4-*aroE*-I-CAT, con el mismo gen fusionado a CAT mediante una secuencia de unión compuesta por 39 pares de bases, y pT4-CAT, como control. Estas construcciones junto con pT4-cons-CAT (secuencia consenso de PRAI ligada a CAT por el mismo linker) y pT4-PRAI, previamente existentes en el laboratorio, fueron transformadas para posteriormente determinar su concentración mínima inhibitoria (MIC). En un principio se pensó que la ausencia del conector promovería una mayor dependencia de CAT a la secuencia fusionada; sin embargo, en base a los resultados obtenidos a partir del MIC, se encontró que la construcción con linker pT4-*aroE*-I-CAT presentó valores ligeramente mayores de resistencia a diferencia de la construcción sin secuencia de unión, pT4-*aroE*-CAT. Dado que la CAT es una proteína homotrimérica, es probable que dicha secuencia, le permita una mayor movilidad y flexibilidad conformacional, reflejada en una mayor resistencia al Cm. Así, y partiendo de la misma hipótesis, ésta misma resistencia se vería alterada si la CAT se encuentra muy cercana al dominio Rossmann, donde la limitación espacial pudiera afectar su desempeño como reportera de expresión. Lo anterior coincide con el resultado obtenido por pT4-CAT, que presentó una resistencia mayor a las 2 construcciones fusionadas a *aroE* y similar a la del vector con la secuencia consenso pT4-cons-CAT. Ya que CAT no se encuentra fusionada a ningún dominio, el trómero se puede mover en libertad, confiriendo así una actividad óptima a la proteína reportera, observable en una alta resistencia al Cm. Por último, en aquellos MIC en los que las células tuvieron que crecer en presencia de Km y Cm, se observó una disminución en la resistencia en comparación con los MIC de sólo Cm, debido a la dificultad de las bacterias para degradar simultáneamente dos antibióticos, en vez de uno.

En la segunda parte del proyecto, se modificó la construcción pT4-*aroE*-CAT y se construyó el vector pBSSK-*ydiB*, ambos con los requisitos necesarios para la generación de librerías truncadas para el ITCHY. Además, se montaron las condiciones del método, en los que se incluyeron pruebas de digestión para las enzimas involucradas como la Exonucleasa III, la endonucleasa Mung Bean y la polimerasa Klenow, así como la preparación de soluciones amortiguadoras. Posteriormente, se llevó a cabo el ITCHY de las librerías truncadas de ambos genes *aroE* y *ydiB*, mediante el cual se obtuvieron 18 quimeras. Dos de ellas, ITB-116 e ITB-62, presentaron un total de pares de bases digeridas de 736 y 660, respectivamente. En ITB-116, el porcentaje de digestión para *aroE* fue del 12%, mientras que para *ydiB* fue del 73.5%; en ITB-62, el porcentaje digerido de *aroE* se estimó en apenas el 1%, contra el 75% para *ydiB*. En base a estos resultados, se puede decir que se obtuvo una variación aceptable de las librerías truncadas, presentando desde el 1% hasta el 75% de digestión de las secuencias fusionadas.

En cuanto a la determinación de la resistencia a antibióticos de las quimeras, ITB-116, presentó una concentración mínima inhibitoria de Amp [200 µg/ml] + Cm [40 µg/ml] para la dilución de alta densidad, y Amp [200 µg/ml] + Cm [20 µg/ml] para la de baja densidad, mientras que el MIC para ITB-62 correspondió a Amp [200 µg/ml] + Cm [>40 µg/ml] y Amp [200 µg/ml] + Cm [>40 µg/ml], para las diluciones de alta y baja densidad, respectivamente.

Por último, recientes hallazgos en el laboratorio de una estructura tipo horquilla (encontrada en las shikimato deshidrogenasas AroE y YdiB), correspondiente a las hélices α -9 y α -10 del dominio C-terminal e involucrada en el buen plegamiento del dominio N-terminal de unión a sustrato, podrían explicar la dificultad en la obtención de un mayor número de quimeras obtenidas, luego de varias rondas de ITCHY y selección por resistencia a antibiótico dada por CAT, reportero de plegamiento.

INTRODUCCIÓN

Aunque los seres vivos y las células que los integran son de apariencia diversa, su organización molecular básica es notablemente similar y muy compleja. El elemento característico de la materia viva es el carbono. Su capacidad de unión a otros elementos como el hidrógeno, oxígeno y nitrógeno, principalmente, lo hacen ideal para la formación de una variedad casi ilimitada de moléculas, que por su origen en sistemas vivos reciben el nombre de biomoléculas, y se clasifican en cuatro grandes grupos: lípidos, carbohidratos, ácidos nucleicos y proteínas. Estas últimas, cuya identidad está especificada en su secuencia de residuos de aminoácidos, son las moléculas estructuralmente más complejas y funcionalmente más sofisticadas y versátiles que se conocen. Dentro de ellas, se distinguen cuatro niveles de organización: la secuencia de aminoácidos es la estructura primaria; los segmentos de una cadena polipeptídica que forman hélices α o láminas β constituyen la estructura secundaria; la conformación tridimensional que forma la cadena polipeptídica se denomina estructura terciaria; y si una molécula proteica particular está constituida por un complejo de más de una cadena polipeptídica, la estructura completa se designa como estructura cuaternaria [Alberts *et al.*, 2010]. De estas estructuras tridimensionales, generadas por el plegamiento de dichas secuencias particulares de aminoácidos que dan a lugar a dominios compactos, dependen las propiedades funcionales de las proteínas. Así, los dominios se definen como las unidades evolutivas, estructurales y funcionales de las proteínas, cuyas interacciones repercuten en el plegamiento y desempeño de las mismas.

Cabe mencionar que muchas proteínas están constituidas por varios dominios, y que un mismo dominio puede encontrarse en una gran variedad de proteínas. Esto se debe a que las proteínas multidominio, producto de la duplicación de dominios, surgieron a razón de una presión selectiva durante su evolución para crear nuevas funciones, y que a partir de éstos ancestros, otras tantas divergieron mediante diferentes combinaciones y asociaciones de dominios. Estas unidades modulares fueron frecuentemente desplazadas, duplicadas e intercambiadas dentro de los sistemas biológicos y entre los mismos, mediante mecanismos de recombinación genética.

Los dominios pueden formar parte de módulos de ensamblaje, como en el caso de partículas de virus o fibras musculares; dotar de actividades catalíticas específicas; o proveer sitios de unión, como los encontrados en enzimas o proteínas reguladoras.

Existen numerosos ejemplos en los que la función general de la proteína depende de las funciones individuales de los dominios, como en el caso en que los residuos de ambos dominios contribuyen a su sitio activo (fosfoglicerato quinasa), o en el que dominios con funciones específicas se recombinan con la finalidad de vincular dos procesos bioquímicos separados (el dominio catalítico y el de unión a NAD en las alcohol deshidrogenasas) [Han *et al.*, 2007].

Las proteínas, además de constituir la mayor parte de la masa de una célula, también ejecutan prácticamente todas las funciones celulares; algunas de ellas especializándose como anticuerpos, toxinas, hormonas, fibras elásticas o fuentes de luminiscencia. Es por esto, que en la búsqueda de una mejor comprensión de los misterios de la vida desde sus orígenes, procesos y patologías, resulta de capital importancia ampliar los conocimientos de todas las áreas referentes a ellas.

ANTECEDENTES

Las enzimas, bien conocidas por su extraordinaria especificidad y poder, son el resultado de millones de años de evolución: reiterados y complejos mecanismos de replicación y selección de grandes poblaciones a través de muchas generaciones que resultan, en este caso, en estructuras limitadas a las funciones y restricciones de los organismos vivos. Dado que de manera natural se encuentran perfectamente adaptadas a su rol fisiológico, la actividad y estabilidad de las proteínas distan de lo que los químicos orgánicos, bioquímicos y biotransformistas requieren [Kaur & Sharma, 2006]. Mientras éstas resultan optimizadas y altamente selectivas para desarrollar las funciones específicas para las que evolucionaron, su desempeño no siempre es el idóneo bajo condiciones industriales relevantes. De esta manera, la ingeniería de proteínas surge para satisfacer la demanda de estrategias y métodos orientados al manejo y mejoramiento de ciertas propiedades básicas y de importancia industrial, tales como estabilidad, actividad, especificidad, plegamiento y solubilidad, entre otras, para la obtención de proteínas con características deseables. Así pues, muchas propiedades deben ser modificadas, siendo estos cambios frecuentemente interdependientes en la obtención de modelos comercialmente útiles para áreas como la farmacología y la biotecnología [Donn, 1997].

EVOLUCIÓN DE PROTEÍNAS

Las proteínas evolucionan de forma natural a través de diversos procesos que incluyen mutaciones en los genes que las codifican (afectando desde un aminoácido hasta regiones enteras como dominios de la proteína), duplicaciones, o arreglos como permutaciones circulares o recombinaciones en el ADN. La posibilidad de emular estos cambios naturales para producir versiones mejoradas o nuevas funciones en las proteínas se observa desde la perspectiva de dos métodos para el diseño de las mismas: El diseño racional y la evolución dirigida.

Diseño racional: Se presupone un conocimiento detallado de la estructura y función de la proteína, en la que se introducen los cambios deseados. Ésta ha resultado una estrategia importante en el entendimiento de algunas preguntas álgidas relacionadas con las propiedades estructurales y funcionales de las proteínas.

Evolución dirigida: Se introducen mutaciones aleatorias en la proteína bajo estudio y se seleccionan sólo aquellas variantes que presentan las propiedades deseadas. Varias rondas de mutación y selección dan lugar a una colección de proteínas modificadas que presentan las características deseadas.

La evolución dirigida, ha emergido como una herramienta tecnológica para generar enzimas con propiedades mejoradas e incluso promover la aparición de actividades nuevas; ambos, eventos de mayor importancia para la industria biotecnológica y para la comprensión de los procesos evolutivos naturales. Se ha demostrado que la evolución dirigida puede ser usada para producir enzimas con propiedades únicas, así como para generar alteraciones en la especificidad del sustrato, termoestabilidad, resistencia a solventes orgánicos y enantioselectividad. Sin embargo, debido al amplio espacio de secuencia de las proteínas, la creación de nuevas funciones enzimáticas, sigue siendo un reto. Este obstáculo no ha detenido el avance en el tema de varios grupos de investigación como el de Xia *et al*, que en 2002 desarrollaron un método basado en la selección por actividad,

mediante el cual obtuvieron fragmentos mutantes de polimerasas de ADN de *Thermus aquaticus*, con actividad de ARN polimerasas [Xia *et al*, 2002].

Por otro lado, y en base a la observación de la existencia de dominios, surgió la idea del intercambio y recombinación de los mismos a partir de enzimas con propiedades diferentes, en la generación de proteínas quiméricas con modificaciones o innovaciones fenotípicas y/o funcionales. Numerosos trabajos indican que dicha recombinación posibilita la generación de nuevas superficies de contacto que optimizan la función preexistente o la modifican hasta el grado de generar nuevas afinidades o catálisis, como el realizado por Wheeldon, Campbell y Banta, en el cual, crearon una quimera bifuncional a partir de la fusión de dominios de una aldo-ceto reductasa termoestable, dos dominios de leucina (tipo zipper α -hélice) formadores de hidrogel, y un dominio de estructura helicoidal. La proteína resultante, que presentó actividad de reductasa y produjo hidrogel activo a temperaturas mayores de 60° C, representa un avance importante en la creación de biomateriales bioactivos para diversas aplicaciones biotecnológicas, entre ellos la ingeniería de tejidos y el desarrollo de biosensores [Wheeldon, Campbell & Banta, 2009].

No obstante las diferentes metodologías, la recombinación de ADN, que puede ser dependiente o no de homología (con un origen común), ha sido una de las más exploradas. Se considera como el fenómeno evolutivo principal en la generación de versatilidad en las proteínas, debido a que permite una amplia exploración del espacio de secuencia y posibilita la generación de nuevos plegamientos [Bogarard & Deem, 1999].

RECOMBINACIÓN DE ADN

Entre los métodos de recombinación de ADN dependientes de homología, se encuentran el SteP [Arnold & Aguinaldo, 2002], y el barajeo de ADN o *DNA shuffling* (figura 1.A, pág. 6). En el primero, se adicionan cebadores (primers) a reacciones de PCR con las secuencias templado, con consecuentes y repetidos ciclos de desnaturalización y tiempos muy breves de alineación y extensión. De esta manera, en cada ciclo los fragmentos crecientes se alinean con diferentes templados, en base a la complementariedad de secuencia y su posterior extensión. Por otro lado, el barajeo consiste en la combinación, en un solo experimento, de dos métodos diferentes: la recombinación *in vitro* de secuencias relacionadas provenientes de fragmentación al azar de ADN y de mutagénesis puntuales a pequeña escala [Stemmer, 1994]. Y aunque ha sido una herramienta efectiva en la evolución dirigida, este método no puede explorar una gran porción del espacio total de posibles combinaciones, ya que los puntos de entrecruzamiento entre los genes barajados ocurre sólo en regiones con un alto nivel de identidad y en los loci de homología [Ostermeier *et al*, 1999 b]. Así, a pesar de que la era moderna de la recombinación del ADN se inició con la invención del *shuffling*, siempre existió la desventaja de una fuerte tendencia en la formación de re-ensamblajes parentales en secuencias de ADN que presentaban más de un 70% de homología [An *et al.*, 2006].

Por otro lado, entre más varíen los genes recombinados, más distintos podrían ser los genotipos y fenotipos resultantes. Este fue el hallazgo de Bogarard y Deem, quienes retoman las limitaciones del barajeo de ADN y encuentran que las mutaciones puntuales son incapaces de producir, de manera sustancial, nuevos plegamientos, enfatizando la importancia de una serie de eventos dramáticos en las variaciones del ADN, como los ocurridos en la evolución natural, dados por arreglos, deleciones, transferencias horizontales, inserciones, transposiciones y otras juxtaposiciones no homólogas, en la rápida generación de diversidad proteica. Las simulaciones Monte Carlo que llevaron a cabo demostraron que una eficaz exploración del espacio de secuencia requiere de eventos genéticos jerárquicos, en los que en cada uno de ellos se involucren sustituciones de mayores niveles estructurales. De aquí, que resultó inevitable pensar que los primeros dominios proteicos pudieron

haber surgido como consecuencia de la recombinación y el ensamblaje de un conjunto limitado de fragmentos estructurales capaces de plegarse independientemente; es decir, de duplicación y recombinación de dominios ya existentes [Vogel, Teichmann & Pereira-Leal, 2005].

Desde este punto de vista, se han desarrollado diversas metodologías de recombinación de ADN independientes de homología, (algunos de ellos resultado de la combinación de diferentes técnicas), como el Método por Separado [An *et al*, 2006], el SHIPREC y el ITCHY (con variantes como el THIO-ITCHY) entre otros, siendo éste último, el que nos compete en el presente trabajo.

MÉTODOS DE RECOMBINACIÓN *IN VITRO*

ITCHY

La ingeniería de nuevas funciones catalíticas mediante el intercambio de dominios y la síntesis química de fragmentos peptídicos modificados, se encuentran entre las amplias aplicaciones posibles de la bisección de proteínas; sin olvidar su importancia en el estudio de teorías sobre su evolución, plegamiento, ensamblaje macromolecular, relación estructura-función y mapeo en proteínas de membrana. Esta conversión de monómero a dímero, referida como complementación de proteína por fragmento (PFC) viene siendo el proceso evolutivo reverso en el que los dominios fueron reclutados y fusionados a nivel genético, como en el caso de la ribonucleasa S y la β -galactosidasa [Paschon & Ostermeier, 2004].

Así, en aras de un acercamiento a todos los posibles puntos de bisección de una región dada de una enzima monomérica, que permitieran la conversión de ésta en un heterodímero funcional, se desarrolló uno de los principios del ITCHY: la generación de bibliotecas por truncamiento cíclico y combinación de fragmentos de genes N y C terminales [Ostermeier *et al*, 1999 a].

El método “Incremental Truncation for the Creation of Hybrid Enzymes” o ITCHY, por sus siglas en inglés, es capaz de crear bibliotecas de fusiones combinadas entre genes independientes de homología de ADN (figura 1. B, pág. 6); como demostró Ostermeier en 1999, mediante la obtención de híbridos activos a partir de fragmentos de dos genes de glicinamida ribonucleótido transformilasa de *Escherichia coli* (PurN) y de humano (hGART), con tan sólo el 50% de identidad de ADN y 41% en secuencia de aminoácidos.

En este experimento, se comparó la habilidad del ITCHY en la creación de bibliotecas interespecíficas en relación al barajeo de ADN. Así, mediante el método ITCHY, se logró la identificación de un grupo más diverso de quimeras activas que en las halladas bajo el segundo método. De hecho, las más activas se fusionaron en regiones no homólogas y se encontraron en *E. coli* en mayor cantidad (4 veces) que en aquellas obtenidas por *DNA shuffling*. Así mismo, las fusiones activas obtenidas por ITCHY, demostraron que los entrecruzamientos entre genes en regiones de homología estructural, independientemente de la homología de secuencia a nivel de ADN, son de gran importancia para la creación de enzimas híbridas funcionales. De esta manera, se abre la posibilidad de que las bibliotecas ITCHY puedan tener aplicaciones en la creación de enzimas nuevas por intercambio de dominios y subdominios, así como en la determinación de las relaciones estructura-función mediante la caracterización de híbridos de homólogos interespecíficas.

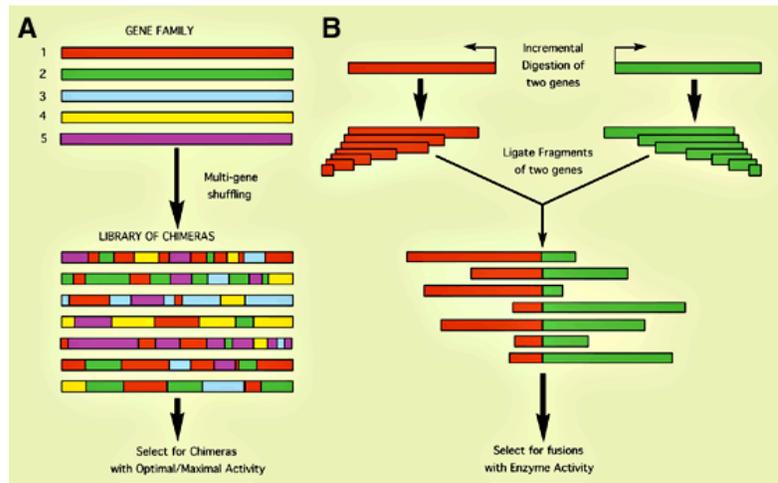


Fig.1. Representación esquemática de estrategias *in vitro* para la recombinación de secuencias génicas. **A.** Barajeo de ADN. **B.** ITCHY (Tomada de Michnick & Arnold, 1999).

Este ingenioso método se basa en la generación de librerías de fragmentos N o C terminales de 2 genes, a partir del truncamiento de las secuencias codificantes. Las bibliotecas con truncados progresivos son generadas por la digestión de los genes parentales con la enzima Exonucleasa III, bajo condiciones controladas. Durante el curso del truncamiento, pequeñas alícuotas son removidas a cortos intervalos para mezclarlas con un buffer bajo en pH y alto en sales, que detiene la digestión. Dado que la exonucleasa digiere el ADN a una tasa relativamente uniforme, los miembros de la biblioteca presentan deleciones progresivas y teóricamente calculadas a nivel de pares de bases (la cantidad transferida y la frecuencia del muestreo mencionadas pueden ser ajustadas para alterar el perfil de truncado). A su vez, las hebras monocatenarias de ADN resultantes de la digestión con la Exonucleasa III, son removidas por la enzima Mung Bean, una nucleasa que reconoce y digiere ADN de una cadena. Finalmente, los extremos son rellenados con la enzima Klenow ADN polimerasa. De esta manera, la posterior fusión de los fragmentos truncados de genes por rasurado, relleno y ligación generan bibliotecas ITCHY.

THIO-ITCHY

A partir de este método surgieron variantes como el THIO-ITCHY, que consiste en la incorporación azarosa y de baja frecuencia, mediante PCR, de nucleótidos α -fosfotioatos en el ADN diana. Estos nucleótidos análogos protegen al ADN de la digestión por exonucleasa, dando lugar a la variación deseada sobre la longitud de las secuencias truncadas mediante su tratamiento con nucleasa. De esta manera, se elimina el tiempo de muestreo y la generación de diversidad deja de estar en función del tiempo de digestión de la exonucleasa, para depender de la distribución azarosa de los nucleótidos α -fosfotioatos. Este tipo de truncamiento progresivo se utilizó en la generación de bibliotecas de fusiones entre fragmentos N terminales del gen de glicinamida ribonucleótido formiltransferasa (PurN) de *E. coli* y fragmentos C terminales del mismo gen (hGART) en humanos, dando como resultado múltiples enzimas híbridas funcionales en una cepa huésped de *E. coli* auxótrofa; incluyendo algunas, con fusiones en regiones de baja homología de secuencia [Lutz, Ostermeier & Benkovic, 2000].

SCRATCHY

A pesar de que estos métodos permiten el libre intercambio de diversidad genética mediante la recombinación entre genes con baja o nula identidad de secuencia, se encuentran limitados a un solo

punto de recombinación. Otros métodos como el SCRATCHY han surgido para ampliar el espacio de exploración de las secuencias. Éste consiste en la combinación de dos métodos de recombinación de genes: el ITCHY y el barajeo de ADN. Durante el primero, como ya se mencionó, se crean una serie de fusiones entre fragmentos de ADN independientes de homología. Estas librerías poseen un solo entrecruzamiento por gen. Luego, esta “familia” artificial es sometida a un *shuffling* de ADN para aumentar el número de entrecruzamientos entre los genes de interés mediante la preservación de los entrecruzamientos por ITCHY y la recombinación de regiones de homología entre los genes [Lutz *et al.*, 2001]. Mediante este procedimiento, Lutz y su equipo lograron obtener librerías SCRATCHY de los genes PurN y hGART, con 2 y hasta 3 entrecruzamientos (figura 2). Aunque dichas quimeras tuvieron una menor actividad en comparación con las proteínas nativas, sí presentaron función, demostrando así un aumento en el acceso al espacio de secuencia y abriendo la posibilidad de obtener proteínas con propiedades modificadas o mejoradas mediante este método.

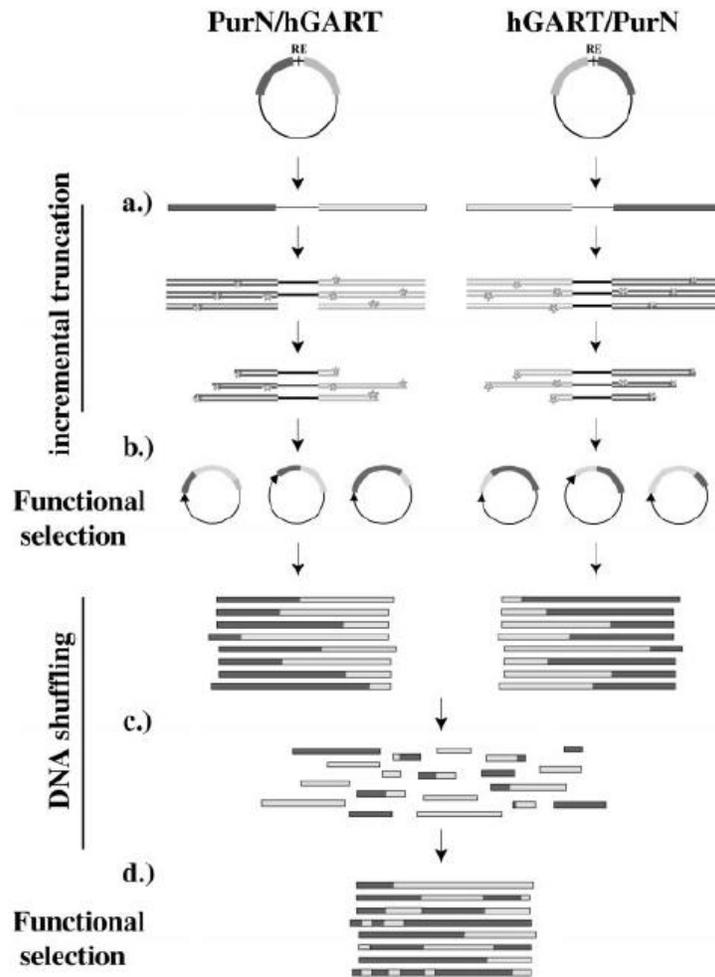


Fig. 2. Técnica SCRATCHY. a) Primero, se generan librerías individuales de 2 genes mediante truncamiento. b) Luego, se ligan los fragmentos de las librerías y se seleccionan por función, tamaño y marco de lectura. c) Posteriormente, se someten a un *shuffling* de ADN. d) Finalmente, se identifican las construcciones funcionales (Tomada de Lutz *et al.*, 2001).

Más tarde, y mediante un mejoramiento del método SCRATCHY con el uso de cebadores sesgados para la amplificación de fragmentos de ADN con puntos de entrecruzamientos no homólogos (primers forward modificados del gen A con primers reverse del gen B), se lograron obtener librerías diversas de quimeras a partir de la Teta 1 glutatión transferasa de humano (hGSTT1)

y la Teta 2 glutatión transferasa de rata (rGSTT2), genes con el 63% de identidad a nivel secuencia de ADN [Kawarasaki *et al.*, 2003].

MODELO DE ESTUDIO

LA VÍA DEL SHIKIMATO

La vía del shikimato es la ruta biosintética utilizada por plantas, hongos, algas, algunos parásitos apicomplejos y bacterias como *Escherichia coli* [Michel *et al.*, 2003] encargada de dirigir el metabolismo de los carbohidratos a la biosíntesis de compuestos aromáticos. Así, en 7 pasos metabólicos, el fosfoenolpiruvato y la eritrosa 4-fosfato son convertidos a corismato, el precursor de los aminoácidos aromáticos tirosina, fenilalanina y triptofano, así como de muchos otros metabolitos secundarios aromáticos como folatos, ubiquinonas, naftoquinonas, vitaminas E y K [Benach *et al.*, 2003]. Todos los intermediarios en la vía pueden ser también considerados como compuestos clave que pueden fungir como sustratos de otras vías metabólicas.

La vía del shikimato, como ya se mencionó, sólo se encuentra en microorganismos y plantas, más nunca en animales [Maclean *et al.*, 2000]. En los microorganismos, esta vía es regulada mediante la inhibición por retroalimentación, así como por represión de la primera enzima; en plantas superiores, no se ha identificado este tipo de inhibición por retroalimentación, lo cual sugiere que la vía de regulación ocurre exclusivamente a un nivel genético. Cabe mencionar, que la penúltima enzima de la vía es el único blanco para el herbicida glifosato. Las plantas tolerantes a esta sustancia representan uno de los sistemas más novedosos para el control de plagas en varias plantas de cultivo [Herrman, 1999]. De aquí que, al ser una vía no existente en animales, se presente como una herramienta con gran potencial para el desarrollo de nuevas alternativas herbicidas.

La Vía del Shikimato

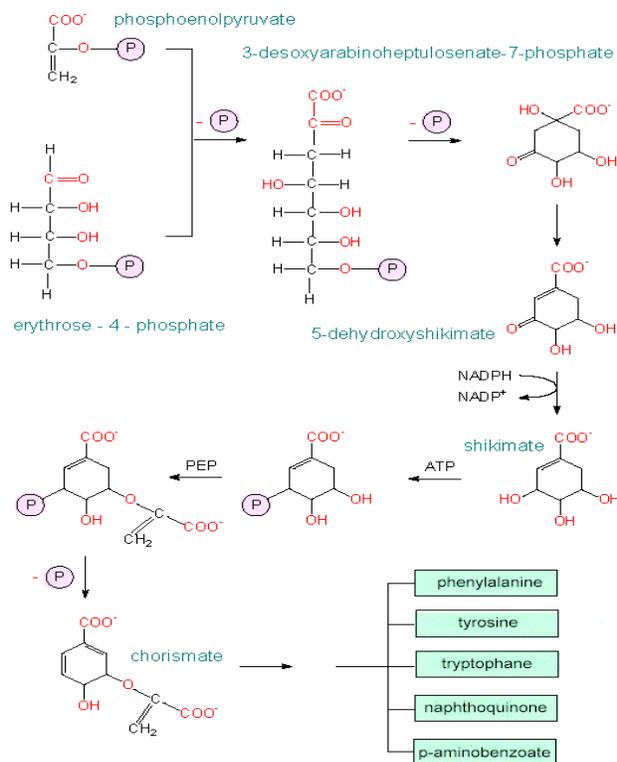


Fig. 3. Vía del Shikimato o ácido (3R, 4S, 5R)-3, 4, 5-trihydroxiciclohex-1-ene-1-carboxílico (Tomada de <http://www.biologie.uni-hamburg.de/b-online/e19/26.htm>).

LAS SHIKIMATO DESHIDROGENASAS

Las shikimato deshidrogenasas (SDH) representan una amplia familia de enzimas con papeles esenciales en metabolismo secundario y se encuentra dividida funcionalmente en 4 grupos: Sdh, YdiB, RifI y Sdh-I, como se encontró en un análisis filogenético realizado por Singh *et al* en el 2008. Cada grupo se puede identificar por motivos característicos de posible importancia en el reconocimiento del sustrato y por los motivos que determinan la especificidad por NADPH o NADH. Así, los hómologos del grupo RifI, de la vía aminoshikimato, se relacionan con la síntesis del antibiótico rifampicina B. Sdh-I, comprende enzimas con menor actividad que la SDH de *E. coli*, con shikimato o quinato como producto. Por su lado, Sdh comprende a las enzimas AroE, siendo su arquetipo la SDH de *E. coli*, mientras que el grupo de YdiB se define como quinato/shikimato deshidrogenasas, ya que poseen doble especificidad de sustrato al quinato y el shikimato.

Cabe recordar que la YdiB de *E. coli*, perteneciente a este grupo, inicialmente se consideró paróloga de AroE [Michel *et al.*, 2003]: sin embargo, en el mencionado análisis filogenético se abordó la posibilidad de que ésta haya sido producto de una transferencia horizontal y neofuncionalización de enzimas de SDH de proteobacterias (Firmicutes), por lo que podría ser más bien una xenóloga de AroE.

AroE

La shikimato deshidrogenasa (E.C. 1.1.1.25) es una enzima monomérica de 30kDa. [Maclean *et al.*, 2000], encargada de catalizar la cuarta reacción de la vía del shikimato que consiste en una reducción dependiente de NADPH, del 3-dihydroxishikimate a shikimate.

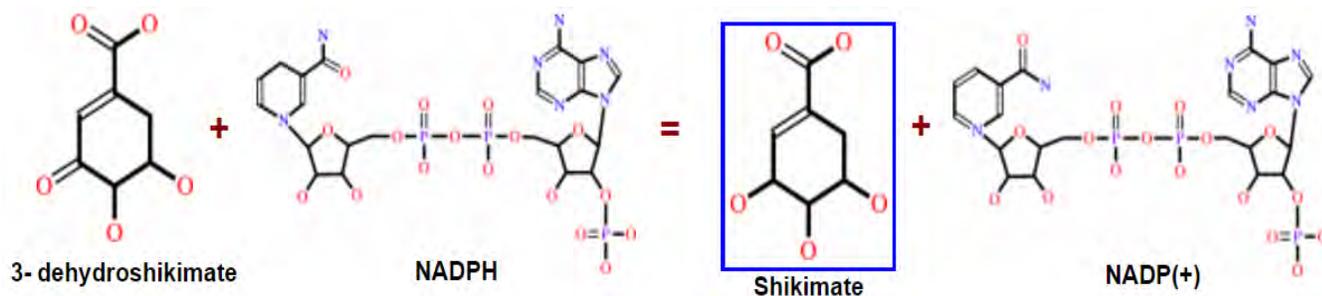


Fig. 4. Reacción catalizada por la Shikimato deshidrogenasa (Tomada de <http://www.ebi.ac.uk/pdbsum/1nyt>).

Trabaja de manera específica con NADP+, pues éste no puede ser sustituido por NAD+. Su nombre sistemático es NADP+3-oxidoreductasa y pertenece a la familia de las quinato/shikimato 5-deshidrogenasas. Esta enzima, específica para esta reacción con sentido reversible, se encuentra en forma de monómero en las bacterias, como parte de una enzima funcional en plantas, y como el cuarto dominio de un polipéptido funcional en hongos [Maclean, 2000]. Es codificada por el gen *aroE* en *Escherichia coli* y posee una longitud de 819 pb.

A partir de un estudio cristalográfico de su estructura, se encontró que la proteína de 271 residuos de aminoácidos presenta una cavidad correspondiente al sitio activo, formada por la unión de dos dominios.

SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE AroE

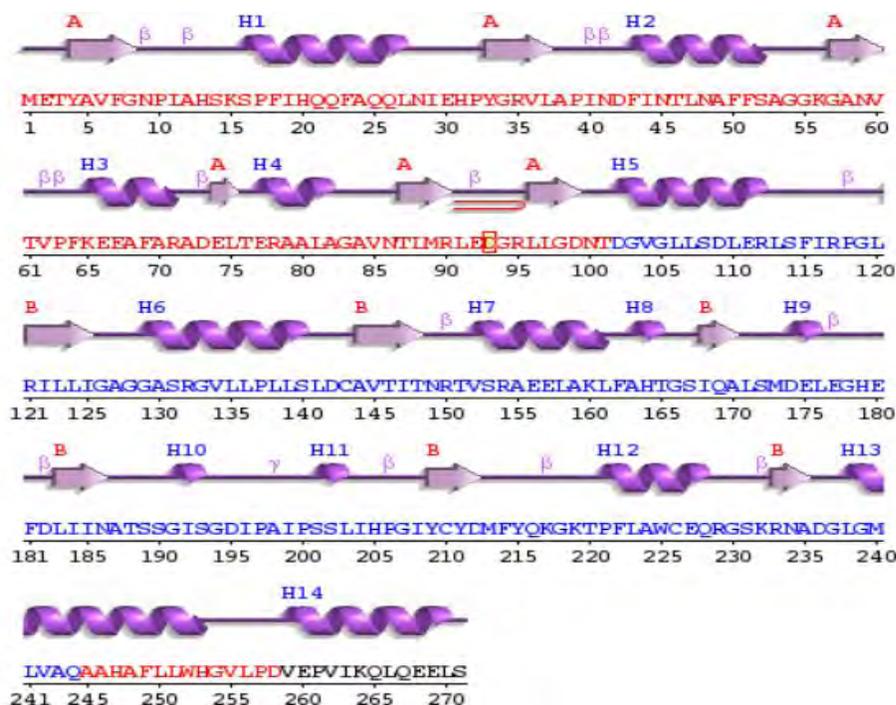


Fig. 5. Secuencia de aminoácidos de AroE con sus respectivas estructuras. En un cuadrado amarillo se indica el residuo catalítico. (Tomada de <http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/cgi-bin/pdbsum/GetPage.pl?pdbcode=1nyt&template=protein.html&r=wiring&l=1&chain=A>).

El dominio N-terminal, constituido por los residuos 1-101, es el responsable de la unión a sustrato, posee un plegamiento único de tipo $\alpha\beta\alpha$ sándwich que consiste en 6 cadenas β formando un giro de hoja β con cuatro α hélices y dos hélices que convergen con las caras de las hojas β . Por otro lado, en el dominio C-terminal formado por los residuos 102 – 271, se reconoce fácilmente un plegamiento tipo Rossmann. En AroE, la tercera y la cuarta hélices de este plegamiento son reemplazadas por asas irregulares, que dan como resultado dominios Rossmann pequeños.

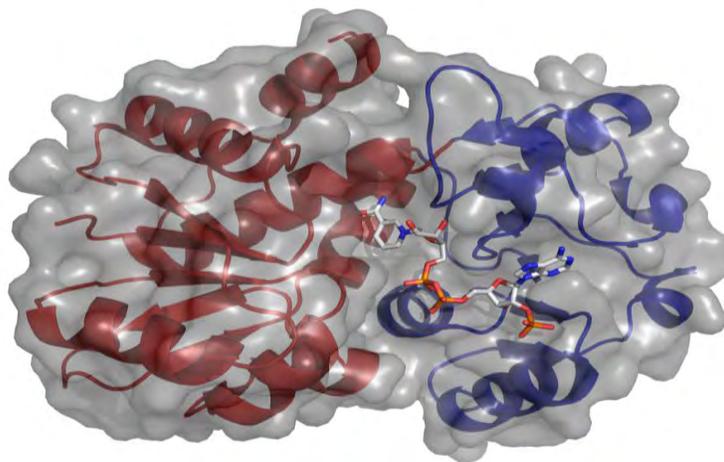


Fig. 6. Estructura de la SDH con sus dos dominios (N-terminal en rojo y Rossmann en azul) y su cofactor NADP (Dr. Lorenzo Segovia, comunicación personal).

YdiB

El gen *ydiB* comparte el 27% de identidad en secuencia de aminoácidos con *aroE* [Benach *et al.*, 2003]. El alineamiento de ambas secuencias se presenta en el Anexo, página 79.

YdiB, consta de una secuencia de 867 pb que codifica para 287 residuos de aminoácidos. Esta proteína (EC 1.1.1.282) es capaz de reducir NAD⁺ o NADP⁺ de manera indistinta en presencia de los ácidos shikímico y quínico [Michel *et al.*, 2003]. Sin embargo, esta amplitud de especificidad al sustrato y al cofactor, tiene un costo, y esto reside en que a diferencia de *aroE*, *ydiB* tiene una eficiencia catalítica disminuida, que va de 2000 a 4000 veces menor. Esta baja actividad específica podría ser la razón por la cual no se identificó desde un principio, junto con *aroE*, durante la purificación inicial de dicha actividad en *E. coli*. Lo anterior, abre la posibilidad de que los sustratos fisiológicos de *ydiB* no sean los sugeridos (shikimato/quinato). A nivel de plegamiento, cabe mencionar que la cuarta hélice α , presente en los dominios Rossmann, está ausente en esta proteína. Además, parece formar dímeros, a diferencia de AroE.

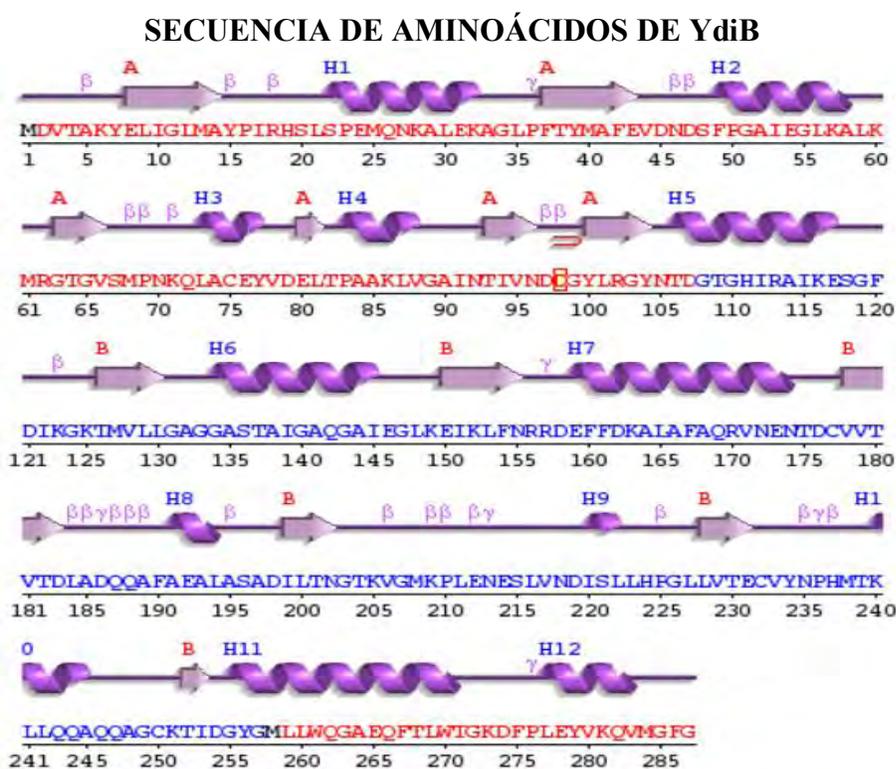


Fig. 7. Secuencia de aminoácidos de YdiB con sus respectivas estructuras. En un cuadrado amarillo se indica el residuo catalítico. (Tomada y editada de <http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/cgi-bin/pdbsum/GetPage.pl?pdbcode=1npd&template=protein.html&r=wiring&l=1&chain=A>).

A pesar de poseer una identidad de secuencia relativamente baja, como ya se mencionó, AroE y YdiB tienen una alta similitud estructural, pues adoptan el mismo plegamiento. Ambas proteínas tienen 2 dominios con arquitectura α/β conectados por la hélice α -5 y una corta secuencia de 17 aa., entre los cuales se crea una hendidura donde se localiza el cofactor específico para cada uno. También comparten una flexibilidad conformacional que sugieren cambios (switch) de conformación abierta a cerrada y viceversa durante la unión a sustrato, además de ser las únicas dos

proteínas de la familia de las SDH presentes en *E. coli*. Ambas estructuras, exhiben un **RMSD** de **2.5 Å**.

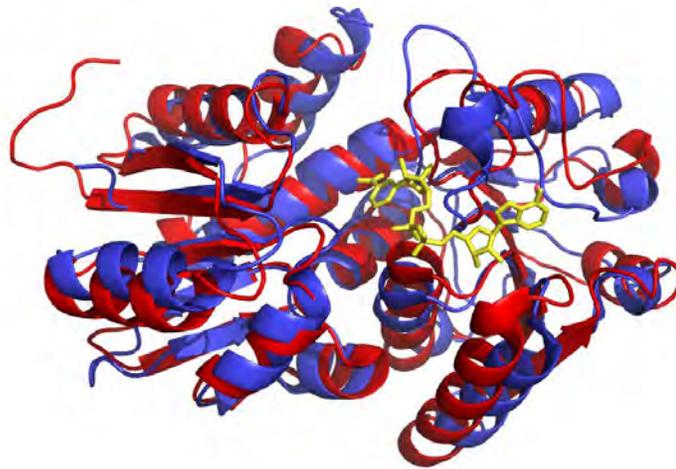


Fig.8. Sobreposición estructural de AroE (rojo) y YdiB (azul). En amarillo se observa la unión a cofactor (Dr. Lorenzo Segovia, comunicación personal).

Por último, cabe destacar que las deshidrogenasas dependientes de NAD(P) son un modelo valioso, ya que cuentan con un dominio versátil y antiguo (el plegamiento Rossmann), presentan la función en la interfaz de los dos dominios, y por su importancia industrial. El análisis de la estructura de las shikimato deshidrogenasas, proveerá de información sobre el reconocimiento de sustrato por las enzimas, y permitirá enfocar los estudios a la manera en cómo pueden ser diseñados sus inhibidores [Ye *et al.*, 2003].

PLEGAMIENTO ROSSMANN

Un plegamiento Rossmann, por lo general contiene los siguientes elementos:

- 1) Un motivo beta/alfa/beta.
- 2) Una secuencia consenso de unión a fosfato, GXGXXG.
- 3) 6 residuos hidrofóbicos pequeños.
- 4) Un residuo básico (Arg o Lys) al inicio de la primera cadena Beta.
- 5) Un residuo básico (Glu o Asp) al final de la segunda cadena Beta.

De manera general, se puede decir que el plegamiento Rossmann, también conocido como plegamiento de unión a mononucleótido, consiste en dos motivos de unión a mononucleótido que, como se observa en la figura 9, forman una hoja β paralela de 6 cadenas flanqueada por α -hélices, con un orden relativo de cadena: 321456 [Bottoms *et al.*, 2002]. Este plegamiento es uno de los más representados de entre los plegamientos $\alpha\beta$ [Mirny & Shakhnovick, 1999].

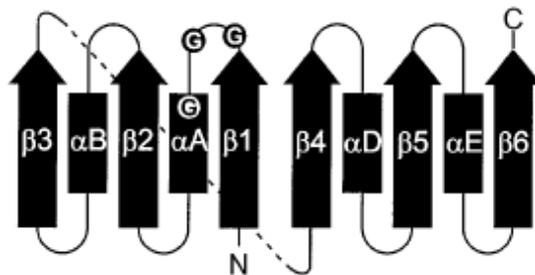


Fig. 9. Topología de un plegamiento Rossmann clásico. Las flechas indican estructuras de cadenas, los rectángulos denotan hélices. Los círculos representan a su vez, residuos conservados de glicinas (Tomada de Lutz *et al.*, 2001).

Es importante mencionar que en un estudio llevado a cabo mediante comparaciones computacionales de complejos de enzimas [Bottoms *et al.*, 2002], se encontró que las moléculas de agua conservadas (encontradas en interacción con los dinucleótidos del *loop* de unión a fosfato rico en glicinas), parecen ser una característica estructural inherente al dominio de unión a dinucleótido, correspondiente al clásico plegamiento Rossmann. Esto significa que dichas moléculas conservadas, contribuyen de manera importante en el reconocimiento del cofactor.

Se sabe que la estructura Rossmann posee un super-sitio con residuos funcionales localizados en el extremo terminal C de las cadenas β . De hecho, en este tipo de plegamiento el super-sitio y el núcleo se encuentran muy cercanos uno del otro; la razón principal se debe a que la mayoría de las proteínas que cuentan con este tipo de plegamiento, son enzimas. De esta manera, la catálisis química llevada a cabo por estas enzimas requiere de una localización precisa así como una coordinación espacial de los grupos electrofílicos y nucleofílicos [Mirny & Shakhnovich, 1999].

Las reacciones catalizadas por enzimas con el plegamiento Rossmann comprenden todas aquellas categorizadas por la Comisión de Clasificación Enzimática, que son 6: Oxidoreductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas y ligasas.

CLORANFENICOL ACETIL TRANSFERASAS (CAT)

La CAT, es una proteína homotrimérica altamente soluble, de 25kDa de peso molecular que mantiene su actividad de conferir resistencia bacteriana al cloranfenicol cuando se fusiona a otras proteínas diversas [Maxwell *et al.*, 1999]. Su gen (*cat*) fusionado a una secuencia, sirve tanto como marcador selectivo como para fines de fusión génica para reportaje de expresión y plegamiento [Robben *et al.*, 1993]. La unión de su extremo N- terminal al extremo C- terminal de otra proteína, no afecta su resistencia al Cloranfenicol, lo que la capacita para reportar la expresión y el plegamiento de aquellas proteínas a las que se le fusiona.

Esta proteína, aislada por primera vez de *E. coli*, actúa mediante la acetilación del cloranfenicol, inactivando al antibiótico que se une al ribosoma en la unidad 50S, bloqueando a la enzima peptidil-transferasa. Por sus características y su ausente actividad endógena en células de mamífero y otras células no bacterianas, la *cat* ha sido ampliamente utilizada para diversos fines al fusionarse a promotores y otros elementos de control transcripcional en plásmidos recombinantes, para su posterior transfección en células [Thorner *et al.*, 1982]. Tal es el caso, del trabajo realizado por el equipo de Arnold, en el cual se fusionó el gen de la CAT a una librería híbrida de proteínas humanas

y bacterianas para la selección de variantes solubles correctamente plegadas [Sieber, Martínez & Arnold, 2001].

Partiendo del potencial de esta enzima como herramienta de expresión génica, se analizó la interacción de la CAT en presencia y ausencia de secuencias de unión a las proteínas blanco y se aprovechó como estrategia de selección de variantes correctamente plegadas mediante su detección en medios con cloranfenicol. Posteriormente, algunas de éstas variantes fueron modificadas para generar a su vez construcciones ITCHY, también caracterizadas con ayuda de la CAT.

Resumiendo, en el presente proyecto se buscó aplicar la metodología ITCHY sobre algunas de las variantes mencionadas (previa preparación) para generar proteínas híbridas independientes de homología a partir de secuencias homólogas remotas.

HIPÓTESIS

- ♣ La aplicación del método ITCHY independiente de homología, generará proteínas híbridas a partir de las secuencias homólogas remotas *aroE* y *ydiB* de *E. coli*.

OBJETIVO GENERAL

- ♣ El objetivo del presente proyecto, es la generación de quimeras activas a partir de la recombinación de ADN de los genes *aroE* y *ydiB* de *E. coli*, mediante el ITCHY; así como el análisis de las restricciones y alcances de este método, para la obtención de quimeras funcionales a partir de secuencias no homólogas.

OBJETIVOS PARTICULARES

- ♣ Construir los vectores pT4-*aroE*-CAT, pT4-*aroE*-l-CAT, el control pT4-CAT y el vector pBSSK-*ydiB*.
- ♣ Analizar y comparar la resistencia a cloranfenicol de AroE dada por la fusión traduccional de su dominio Rossmann a CAT, en ausencia y presencia de secuencia de unión.
- ♣ Generar quimeras a partir de las construcciones pT4-*aroE*-CAT y pBSSK-*ydiB*, por medio de ITCHY.
- ♣ Caracterizar quimeras en base a sus secuencias y resistencia a antibióticos.

MATERIALES Y MÉTODOS

CULTIVOS CELULARES

Durante el desarrollo de este proyecto, se utilizó la cepa de *E. coli* **XL1Blue-MRF'**. En los casos en los que ésta fue requerida, se picaron colonias de placas frescas para posteriormente crecerlas en LB líquido [Sambrook, 1989] con tetraciclina a 30° C por 16 horas para posteriormente plaquearse en cajas con el mismo antibiótico y transformarse, almacenarse en pellets o utilizarse en PCR.

También se utilizó la cepa de *E. coli* **MC1061** resistente a estreptomycin, donada por Humberto Flores (IBT), principalmente para efectos de transformación de vectores.

La eficiencia de las células electrocompetentes preparadas de ambas cepas, fue en todos los casos, mayor a 1×10^8 transformantes por μg de ADN.

Cabe mencionar, que para todos los cultivos en líquido o en placa se utilizó medio LB con el antibiótico requerido para el experimento en cuestión. Los antibióticos utilizados fueron ampicilina, kanamicina, tetraciclina, cloranfenicol y estreptomycin a diferentes concentraciones. En algunos casos que así lo requerían, al cloranfenicol se le añadió IPTG a una concentración de 0.5mM. Los cultivos fueron incubados a 30 ° C o 37 ° C.

BIOLOGÍA MOLECULAR

PLÁSMIDOS

A continuación se mencionan los plásmidos de los que se partió para desarrollar el presente proyecto.

pT4-cons-CAT [Construido en el laboratorio] Este vector de 3335pbs (figura 13, pág. 22), posee la secuencia consenso de PRAI y un conector o “linker” de 39 pb. Su gen *cat* de 684 pb, incluye 27 pb que codifican para la cola de histidinas. Proviene del plásmido **pT4** [Construido en el laboratorio del Dr. Hilvert, ETH, Suiza; donado por J. Osuna (IBT)], que es un vector de expresión en *E. coli* de 1845 pb (originalmente). Contiene el marcador de resistencia a kanamicina y origen de replicación pUC, siendo un plásmido de alto número de copias. También contiene al promotor transcripcional medianamente fuerte **ptrc**.

pBSSK⁻ [Stratagene, EE.UU] Es un vector de expresión de 2958 pb. Contiene el marcador de resistencia a ampicilina y origen de replicación pUC. También presenta el promotor transcripcional **plac** y los promotores T7 y T3 flanqueando la MCS (figura 14).

Estas construcciones, junto con aquellas resultantes del trabajo realizado, se detallan en la tabla de plásmidos, (Anexo, pág. 81).

ELECTROFORESIS

Se utilizaron geles de agarosa con solución amortiguadora TAE [Sambrook, 1989] grado ADN (Bio-Rad®), a diferentes porcentajes (1%, 1.5% o 2%), dependiendo de la resolución que se necesitara. Los geles se cargaron en cámaras de electroforesis con la misma solución. Cada gel se

corrió con las muestras respectivas y con el marcador GeneRuler DNA Ladder Mix de Fermentas (figura 27, pág. 49), que permite medir la longitud del ADN en un rango que va desde los 100 hasta los 10,000 pb. Los geles se tiñieron con el agente intercalante, Bromuro de Etidio.

Resulta importante mencionar, que a pesar de que no se haga mención de ellos a lo largo del presente trabajo (por razones de síntesis y agilidad en la lectura), en cada uno de los pasos de la metodología se corrieron una serie de geles corroborativos, además de los preparativos y extractivos. En ellos se confirmó principalmente que los productos no se hubieran perdido en los diferentes pasos, a la vez que permitieron conocer la concentración de los mismos.

ELECTROPORACIÓN

Para introducir los vectores en las células hospederas, proceso que también se conoce como transformación, se llevó a cabo la electropermeabilización o electroporación. Mediante este sistema, se provoca un aumento significativo de la conductividad eléctrica y la permeabilidad de la membrana plasmática celular por un campo eléctrico aplicado externamente. Así, en condiciones estériles y con un electroporador ajustado a 25 μ F y 200 Ω , se aplican pulsos de 1.8 V. De esta manera, a las células electrocompetentes (XL1Blue o MC1061) se les añadió la ligación correspondiente en cada caso y se les transfirió a una celda para posteriormente aplicarles el pulso. Inmediatamente después, se les recuperó con medio SOC y se incubaron una hora a 37° C, para luego ser plaqueadas y seleccionadas.

AMPLIFICACIÓN, EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ADN

Amplificación de ADN por PCR: Para amplificación de ADN a partir de colonias, plásmidos o insertos, se prepararon reacciones de PCR. Éstas incluyeron, con sus respectivas variaciones en volumen y concentración dependiendo el caso: MgCl₂ (*GibcoBRL*®), solución amortiguadora o buffer (*GibcoBRL*®), dNTP's, enzima polimerasa (Ampli Taq GOLD o Taq DNA pol), oligonucleótidos, agua tetradestilada, así como los respectivos templados en cuestión. Las reacciones fueron amplificadas en un termociclador *Stratagene*®

Purificación de productos de PCR: Los productos de PCR, así como los insertos digeridos (que se siguen considerando como productos de PCR) se purificaron mediante el uso de soluciones y columnas de *Roche*® (High Pure PCR Product Purification Kit).

Purificación de plásmidos: Se inocularon colonias aisladas, cada una en un volumen de 3-5 ml de medio LB con el antibiótico correspondiente y se incubaron a 30° C, por un aproximado de 16 h. Posteriormente se colectaron las células por centrifugación y se purificaron los plásmidos por lisis alcalina, con soluciones y columnas de *Roche*® (High Pure Plasmid Isolation Kit).

Purificación de ligaciones: Con el fin de remover las enzimas, sales, buffer y demás residuos de las reacciones de ligación para su posterior transformación, se utilizó Butanol y Etanol al 70%. Mediante varios pasos de agitación y centrifugado en conjunto con el uso específico de estos alcoholes, y en un paso final que conlleva a la remoción de estos mismos por evaporación (en un equipo evaporador centrífugo concentrador de la marca Savant), se obtienen ligaciones purificadas para posteriormente ser diluidas en agua tetradestilada.

Extracción de ADN a partir de geles de agarosa: Los fragmentos de ADN digeridos para clonaciones y otros usos, se extrajeron de geles de agarosa con soluciones y columnas de *Qiagen*[®] (Qiaquick Gel Extraction Kit).

DIGESTIÓN Y LIGACIÓN DE ADN

Digestiones: Las reacciones de digestión llevadas a cabo durante la obtención de las construcciones y sus respectivos insertos contenían el ADN a digerir, las enzimas de restricción (*Biolabs*), así como sus buffers de activación, agua tetradesilada y BSA 10X, en los casos en los que las enzimas lo requirieran. Cabe mencionar, que tanto en las dobles como en las triples digestiones realizadas, se corroboró que las enzimas trabajaran de manera eficaz en la misma solución amortiguadora. Además, cada una de las mezclas se distribuyeron en diferentes tubos para asegurar una mayor eficiencia enzimática. Las reacciones se incubaron entre 12 y 16 horas a la temperatura que requirieran las enzimas, pero por lo general ésta fue de 37° C. En casos de digestiones rápidas para cálculo o corroboración, se dejaron 2 horas. Los volúmenes finales de las preparaciones, variaron.

Ligaciones: Las reacciones de ligación se realizaron con una relación molar aproximada de 1:4 vector: inserto, respectivamente. Todas ellas incluyeron agua tetradesilada, buffer 10X para ligasa, T4 ligasa de la marca *Biolabs*, así como el vector y el inserto previamente digeridos. Los volúmenes finales, tiempo y temperatura de dichas mezclas también variaron. Por lo general, se manejaron volúmenes pequeños (20-25µl); las temperaturas fueron desde los 4° C, 16° C e incluso temperatura ambiente, y los tiempos de 12 a 16 horas, dependiendo las condiciones.

ENZIMAS Y BUFFERS

Exonucleasa III: Esta enzima remueve de manera progresiva los mononucleótidos del extremo hidroxil 3' de ADN bicatenario. Sus sustratos son los extremos 3' romos y los extremos 3' rezagados; sin embargo, los extremos 3' sobresalientes de 4 bases o más son resistentes al corte y no es activa en ADN de una sola hebra. Las fluctuaciones de temperatura, los cambios en la concentración de sales, así como la concentración de la enzima en relación al ADN a digerir, pueden afectar ampliamente su actividad, por lo que las condiciones de reacción deben ser diseñadas a la medida de su aplicación específica y cuidadosamente ajustadas. La preparación del buffer amortiguador, así como el de STOP para esta enzima, se detalla en el Apéndice, pág. 88.

Endonucleasa Mung Bean: Es una enzima específica para ADN o ARN de una sola hebra. Degrada los extremos finales de moléculas de ADN unicatenario o ARN, dejándolos romos, rasurados y ligables. Es activa tanto en dirección 5' como 3'.

Fragmento Klenow (ADN Polimerasa I): Es un producto de proteólisis de la ADN polimerasa I de *E. coli*, que conserva la actividad de polimerización así como de exonucleasa en dirección 3' a 5', pero carece de actividad de exonucleasa en sentido 5' -3'. Dicho de otro modo, esta enzima es capaz de rellenar los extremos 5' sobresalientes y remover extremos 3' sobresalientes para formar extremos romos. La preparación de su solución amortiguadora se encuentra en el Apéndice, página 87.

OLIGONUCLÉOTIDOS

Todos los oligonucleótidos utilizados fueron sintetizados en la Unidad de Síntesis del Instituto de Biotecnología, UNAM. Cada uno de ellos, fue diseñado tomando en cuenta los sitios de restricción de los vectores e insertos en cuestión, así como las direcciones de las secuencias (Anexo, pág. 80).

CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (MIC)

La concentración mínima inhibitoria o MIC por sus siglas en inglés, hace referencia a la concentración más baja de antibiótico necesario para inhibir el crecimiento de un microorganismo después de su incubación. Mediante el MIC, en otras palabras, se conoce la resistencia de las cepas a los antibióticos a los que son sometidas.

Para determinar dicha concentración, el proceso inicia en la transformación de las construcciones, así como de controles positivos y negativos en las células hospederas. Después, se cuida la estandarización del proceso; es decir, se busca que el volumen de células transformadas plaqueadas, sea más o menos el mismo, evitando sesgar los resultados del experimento por cantidad de células y no por resistencia. Así, ya sea que se transforme el mismo volumen para cada construcción en una cantidad equivalente de células electrocompetentes receptoras, o bien se dejen crecer éstas ya transformadas en cultivos cuyas densidades ópticas (OD's) sean monitoreadas hasta que todas compartan valores de entre 2 y 3 unidades (cada OD contiene aproximadamente 5×10^8 células /ml), la estandarización debe llevarse a cabo antes de las diluciones del cultivo y su posterior plaqueamiento. Una vez estandarizado el proceso, se plaquean gotas con las diluciones de las células transformadas y crecidas en cajas con diferentes concentraciones de 1 o varios antibióticos, y por último, se incuban para su crecimiento. El tiempo de incubación es variable pues se encuentra determinado por la capacidad de las células hospederas de adaptarse y por lo tanto, crecer con el vector transformado.

Tanto las diluciones como el plaqueado de las gotas se llevan a cabo en condiciones estériles.

PROGRAMAS DE ANÁLISIS

Con el fin de facilitar el análisis de algunos resultados obtenidos durante el desarrollo del presente trabajo, se utilizaron los siguientes programas:

Chromas Lite 2.01: Este programa, presenta el cromatograma de las secuencias nucleotídicas. El cromatograma es capaz de indicar si se tratan de mutaciones por inserción o errores tipográficos originados durante la lectura automática de la máquina de secuenciación. [Technelysium Pty Ltd, Australia, 2005. URL: www.technelysium.com.au]

SeaView 4.3: Programa que permite el alineamiento de varias secuencias de nucleótidos para su comparación, análisis y edición, entre otras funciones. [Gouy, M., Guindon, S. & Gascuel, O. Francia, 2010. URL: <http://pbil.univ-lyon1.fr/software/seaview.html>]

pDRAW32 1.0: Programa desarrollado para la visualización (lineal/circular), edición y análisis de secuencias de ADN. Incluye enzimas de restricción, insertos, traducción de ORF's, fragmentos de digestión, análisis de primers, etc. Durante el proyecto, se utilizó para generar los esquemas de plásmidos a partir de su secuencia. [Olesen, K. AcaClone, Dinamarca, 2011. URL: www.acaclone.com]

DISEÑO Y GENERACIÓN DE LAS CONSTRUCCIONES

SECUENCIAS DE GENES *cat*, *aroE*, *ydiB* Y MAPAS DE LOS PLÁSMIDO pT4-cons-CAT y pBSSK

Con ayuda del Protein Data Bank (PDB) y EcoCYC, se obtuvieron las secuencias del gen *aroE*, así como de *ydiB* de *Escherichia coli*, mientras que la secuencia del plásmido pT4-cons-CAT, construido en el laboratorio del Dr. Lorenzo Segovia (a partir del pT4 construido en el laboratorio del Dr. Hilvert, ETH, Suiza; donado por J. Osuna y la CAT del plásmido pBC SK +/- de Stratagene), se obtuvo de documentos ya existentes en el laboratorio mencionado.

SECUENCIA DEL GEN *aroE*

```

catatg GAAA CCTATGCTGT TTTTGGTAAT CCGATAGCCC ACAGCAAATC
GCCATTCATT CATCAGCAAT TTGCTCAGCA ACTGAATATT GAACATCCCT
ATGGGCGCGT GTTGGCACCC ATCAATGATT TCATCAACAC ACTGAACGCT
TTCTTTAGTG CTGGTGGTAA AGGTGCGAAT GTGACGGTGC CTTTTAAAGA
AGAGGCTTTT GCCAGAGCGG ATGAGCTTAC TGAACGGGCA GCGTTGGCTG
GTGCTGTTAA TACCCTCATG CGGTTAGAAG ATGGACGCCT GCTGGGTGAC
AATACCGATG GTGTAGGCTT GTTAAGCGAT CTGGAACGTC TGTCTTTTAT
CCGCCCTGGT TTACGTATTC TGCTTATCGG CGCTGGTGGA GCATCTCGCG
GCGTACTACT GCCACTCCTT TCCCTGGACT GTGCGGTGAC AATAACTAAT
CGGACGGTAT CCCGCGCGGA AGAGTTGGCT AAATTGTTTG CGCACACTGG
CAGTATTCAG GCGTTGAGTA TGGACGAACT GGAAGGTCAT GAGTTTGATC
TCATTATTAA TGCAACATCC AGTGGCATCA GTGGTGATAT TCCGGCGATC
CCGTCATCGC TCATTCATCC AGGCATTTAT TGCTATGACA TGTTCTATCA
GAAAGGAAAA ACTCCTTTTC TGGCATGGTG TGAGCAGCGA GGCTCAAAGC
GTAATGCTGA TGGTTTAGGA ATGCTGGTGG CACAGGCGGC TCATGCCTTT
CTTCTCTGGC ACGGTGTTCT GCCTGACGTA GAACCAGTTA TAAAGCAATT
GCAGGAGGAA TTGTCCGCGT GA ggatcc
  
```

Fig.10. Secuencia de *aroE* (819 pb). En rojo y naranja, secciones de los oligonucleótidos NdeAroE y BamHIAroE, respectivamente (ver pág. 23). El codón en rojo señala el término del dominio N- terminal mientras que el codón en naranja corresponde al inicio del dominio C-terminal. Subrayado, se indica el sitio de restricción NdeI y en verde, el sitio de restricción BamHI. En amarillo, el codón de término.

SECUENCIA DEL GEN *ydiB*

ATGGATGTTA **CCGCAAAATA** **CGAATTGATT** GGGTTGATGG CCTATCCTAT
 CCGCCACAGT TTATCGCCCG AAATGCAGAA TAAAGCCTTA GAAAAAGCGG
 GATTGCCATT TACCTATATG GCCTTCGAAG TGGATAACGA TAGCTTTCCT
 GGAGCAATTG AAGGATTAAA AGCCCTCAAA ATGCGCGGAA CTGGTGTATC
 GATGCCGAAC AAACAACCTGG CGTGTGAATA TGTTGATGAA TTAACACCAG
 CTGCCAAACT GGTGGGGGCC ATCAACACCA TCGTTAATGA TGATGGCTAT
 CTGCGTGGCT ATAACAC**CGA** **CGG**CACGGGC CATATTCGCG CCATTAAAGA
 GAGCGGTTTT GATATCAAAG GCAAAACGAT GGTGCTGTTA GGGGCCGGTG
 GTGCCTCAAC GGCAATTGGC GCGCAGGGGG CAATTGAAGG TTTAAAAGAA
 ATTAAACTCT TTAACCGTCG GGATGAGTTC TTCGATAAAG CCCTCGCCTT
 CGCGCAGCGG GTTAATGAAA ACACCGATTG TGTCGTCACG GTCACCGATC
 TCGCCGATCA GCAAGCCTTT GCTGAAGCCC TGGCTTCCGC CGACATTTTA
 ACCAATGGCA CAAAAGTGGG TATGAAACCC CTTGAGAATG AATCATTGGT
 TAATGATATC AGTCTGTTAC ATCCGGGACT TCTGGTCACT GAATGCGTGT
 ATAACCCGCA TATGACGAAG TTATTGCAGC AGGCGCAACA AGCTGGTTGC
 AAAACGATTG ATGGATACGG CATGTTGTTG TGGCAAGGGG CTGAACAGTT
 CACATTATGG ACTGGCAAAG ATTTCCCTCT GGAATATGTT AAAC**CAGGTCA**
TGGGGTTTCGG **TGCTGA**

Fig. 11. Secuencia de *ydiB* (867 pb). En verde intenso y verde claro, se indican secciones de los oligonucleótidos SacIydiB2 y EPKysiB(R), respectivamente. El codón en rojo, señala el término del dominio del N- terminal; mientras que el codón en naranja, corresponde al inicio del dominio C- terminal. Subrayado, el codón de paro.

SECUENCIA DEL GEN *cat*

GAGAAAAAAA **TCACTGGATA** **TACCACCGTT** GATATATCCC AATGGCATCG
 TAAAGAACAT TTTGAGGCAT TTCAGTCAGT TGCTCAATGT ACCTATAACC
 AGACCGTTCA GCTGGATATT ACGGCCTTTT TAAAGACCGT AAAGAAAAAT
 AAGCACAAGT TTTATCCGGC CTTTATTAC ATTCTTGCCC GCCTGATGAA
 TGCTCATCCG GAATTCCGTA TGGCAATGAA AGACGGTGAG CTGGTGTATAT
 GGGATAGTGT TCACCCTTGT TACACCGTTT TCCATGAGCA AACTGAAACG
 TTTTCATCGC TCTGGAGTGA ATACCACGAC GATTTCCGGC AGTTTCTATA
 CATATATTCG CAAGATGTGG CGTGTACGG TGAAAACCTG GCCTATTTCC
 CTAAAGGGTT TATTGAGAAT ATGTTTTTCG TCTCAGCCAA TCCCTGGGTG
 AGTTTCACCA GTTTTGATTT AAACGTGGCC AATATGGACA ACTTCTTCGC
 CCCC GTTTTC ACGATGGGCA AATATTATAC GCAAGGCGAC AAGTGCTGA
 TGCCGCTGGC GATTCAGGTT CATCATGCCG TTTGTGATGG CTTCATGTC
 GGCAGAATGC TTAATGAATT ACAACAGTAC TGCGAT**GAGT** **GGCAGGGCGG**
GGCGTAActc gag

Fig. 12. Secuencia del gen *cat* sin codón de inicio ATG (657 pb). En azul y rosa, se señalan secciones correspondientes a los oligonucleótidos BamCAT y XhoICAT (cuadro 1), respectivamente. En morado, se indica el sitio de restricción XhoI y subrayado, el codón de término.

MAPA CIRCULAR DE pT4-cons-CAT

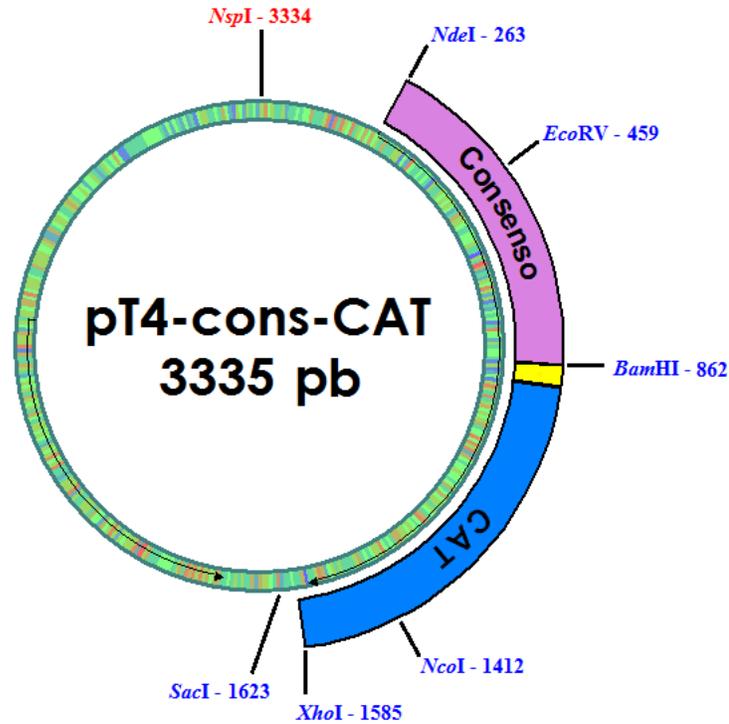


Fig. 13. Mapa circular del plásmido pT4-consenso-CAT y sitios de restricción de las enzimas a utilizar. En violeta, la secuencia consenso. En azul y amarillo, las secuencias de *cat* y el linker, respectivamente.

MAPA CIRCULAR DE pBSSK⁻

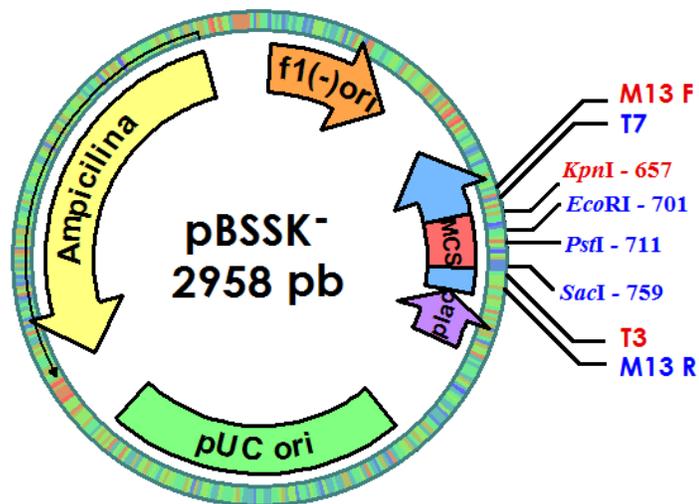
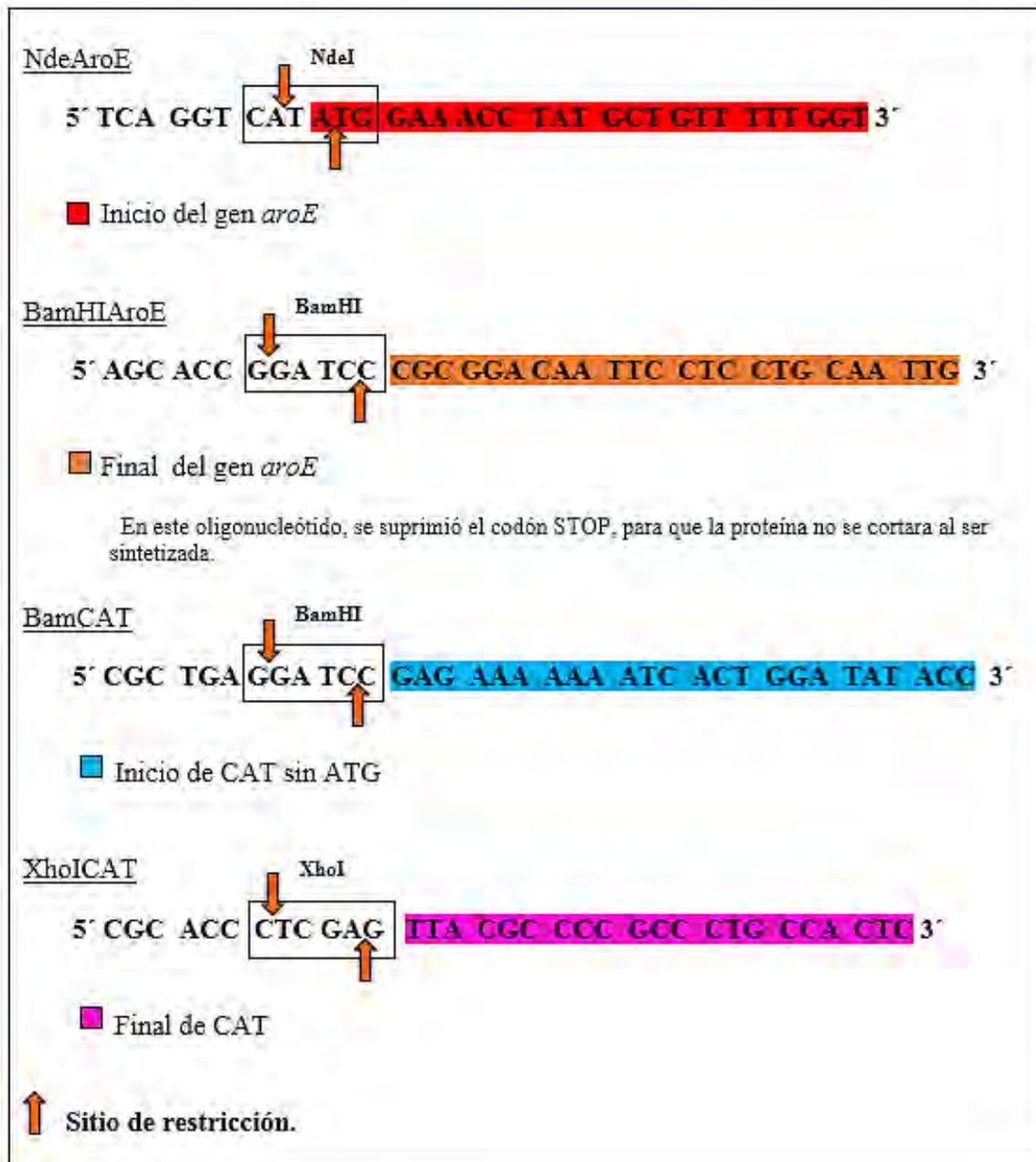


Fig. 14. Mapa circular del plásmido pBSSK⁻. En azul y rojo, se indican los sitios de restricción de las enzimas a utilizar, así como los promotores T3 y T7, y los sitios de apareamiento de los cebadores M13F y M13R. En verde, el origen de replicación pUC; en amarillo, el cassette de resistencia a Ampicilina; en naranja, el origen de replicación f1(-); en morado, el promotor *lac* y en azul, la secuencia codificante de *lacZ*, interrumpida por la zona MCS, en rojo.

A partir de las secuencias y los mapas, se diseñaron los oligonucleótidos para la obtención y manejo de los genes.

DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS

Para amplificar los genes *aroE* y *cat*, se diseñaron los oligonucleótidos respectivos tomando en cuenta tanto la secuencia de los genes en cuestión, así como la del plásmido pT4, identificando los sitios de restricción útiles para la clonación (Nde I, BamHI, y XhoI).



Cuadro 1. Oligonucleótidos para construir pT4-*aroE*-I-CAT y pT4-*aroE*-CAT. Se muestran los oligonucleótidos diseñados, las zonas de restricción así como parte de las secuencias que involucran.

Una vez sintetizados los cebadores, se procedió a la construcción de los vectores a partir del plásmido pT4-cons-CAT. Los pasos que se siguieron para su generación se encuentran en el Diagrama 1, pág. 27.

♣ CONSTRUCCIÓN DE pT4-aroE-I-CAT

Obtención del inserto: Para amplificar el gen *aroE*, se prepararon 3 reacciones de PCR de colonia con los oligonucleótidos NdeAroE y BamHIAroE, a 50 pmol, 25 pmol y 5 pmol, a un volumen final de 100 µl (ver cuadro 1). A cada reacción se le agregaron 4 colonias frescas de XL1Blue portadoras del ADN del cual se amplificó el gen.

- 1 ciclo de desnaturalización (95 °C por 10 min)
- 5 ciclos de amplificación (94 °C por 1 min, 45 °C por 1.5 min, 72 °C por 1.5 min)
- 20 ciclos de extensión final (94 °C por 1 min, 55 °C por 1.5 min, 72 °C por 1.5 min)

El producto de las reacciones se purificó a partir de un gel de agarosa. Posteriormente, se llevó a cabo una digestión doble del gen con las enzimas NdeI y BamHI, para dejarlo como inserto viable y éste mismo se purificó (diagrama 1.B, pág. 27).

Preparación del vector: Dado que el vector donde se insertaría *aroE* sería el plásmido pT4-cons-CAT, previamente existente pero sin la secuencia consenso, a partir de una muestra donada de dicho vector, éste fue electroporado en la cepa XL1 Blue. Posteriormente a la recuperación de las células en medio SOC, se plaquearon en cajas con Kanamicina. De las colonias crecidas, se picaron algunas para su crecimiento en LB líquido también con Km, de donde se purificó el plásmido. Seguidamente, el vector fue sometido a una digestión triple con las enzimas NdeI, EcoRV y BamHI para eliminar eficientemente la secuencia consenso, delimitada por NdeI en su parte N- terminal y por BamHI, en su parte C- terminal. El sitio de restricción para EcoRV se encuentra entre ambos sitios. El uso de esta enzima, tuvo como finalidad evitar digestiones parciales lineales que pudieran dar como resultado plásmidos religados (diagrama 1.A)

El producto de la digestión triple se purificó a partir de gel de agarosa.

Ensamblado de pT4-aroE-I-CAT: La reacción de ligación de los 2 productos, el vector y el inserto, se dejó toda la noche a una temperatura de 4° C, para luego purificarse y transformarse en XL1Blue (diagrama 1.C). Dicha transformación se plaqueó en LB+Km y de las colonias resultantes, se picaron 6 para crecimiento en LB líquido + Km, toda la noche. Ulteriormente, se purificó plásmido de las 6 clonas, mismas que se sometieron a digestiones diagnósticas para corroborar el inserto. Una vez confirmado lo anterior, se secuenciaron.

Secuenciación

Cada uno de los plásmidos de las 6 clonas se enviaron a secuenciar con los oligonucleótidos CAT100 (111 pb iniciada su secuencia y en sentido reverso) y pT4 (60 pb antes de la caja TATA de pT4 previa al sitio NdeI).

Los resultados de la secuenciación se analizaron con ayuda de los programas Chromas Lite y SeaView. Así, se detectó que la **clona 5** era la que portaba la construcción exitosa **pT4-aroE-I-CAT**.

♣ CONSTRUCCIÓN DE pT4-aroE-CAT

A partir del vector obtenido pT4-aroE-I-CAT, se llevaron a cabo una serie de pasos para la generación del plásmido pT4-aroE-CAT. Una versión similar, pero sin linker:

Obtención del inserto: Para amplificar el gen *cat* sin linker a partir de plásmido, se llevó a cabo una sola reacción de PCR con los oligonucleótidos BamCAT y XhoI-CAT a 25 pmol c/u, y el plásmido pT4-cons-CAT como templado, a un volumen final de 100 μ l.

- 1 ciclo de desnaturalización (95 °C por 5 min).
- 25 ciclos de amplificación (94 °C por 1 min, 55 °C por 1 min, 72 °C por 1 min).
- 1 ciclo de extensión final (72 °C por 10 min).

La secuencia de *cat* amplificada se purificó a partir de gel de agarosa. Posteriormente, se sometió a una digestión doble con las enzimas BamHI y XhoI, y se volvió a purificar (diagrama 1.E, pág. 27).

Preparación del vector: Se realizó una digestión triple sobre el vector pT4-aroE-I-CAT (clona 5) para remover el linker y la CAT, con las enzimas BamHI, NcoI y XhoI. La primera con sitio de restricción al final de la secuencia consenso y principio del linker; la segunda ubicada a las 510 pb del inicio de CAT y la última al término de ésta. La digestión fue purificada (diagrama 1.D).

Ensamblado de pT4- aroE-CAT

Tanto el inserto *cat* como el vector previamente digeridos y purificados, se sometieron a una ligación a temperatura ambiente por 2 horas (diagrama 1.F). Esta reacción fue purificada, transformada y plaqueada. De las colonias crecidas, se picaron 6 y se pusieron a crecer en LB líquido + Km, toda la noche. Posteriormente, se les extrajo el plásmido y se secuenciaron.

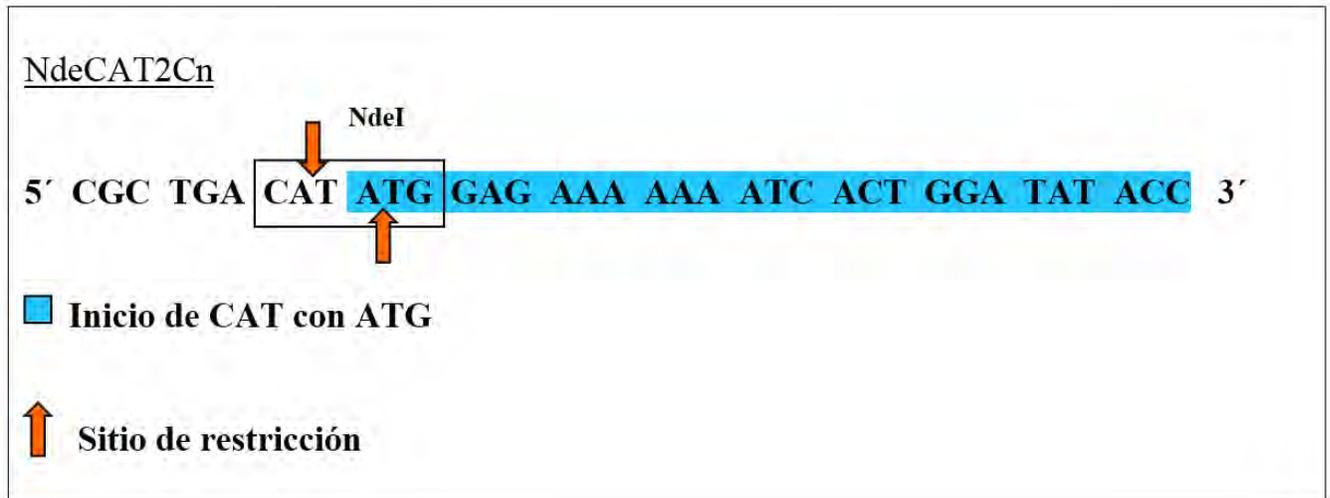
Secuenciación

Las reacciones se llevaron a cabo con los oligonucleótidos CAT100 y pT4. Mediante el análisis con Chromas Lite y SeaView, se encontró que la **clona 6**, contenía la construcción **pT4-aroE-CAT**.

♣ CONSTRUCCIÓN DEL CONTROL pT4-CAT

Para esta construcción se requirió diseñar un oligonucleótido específico para amplificar *cat* con su codón inicial ATG y sitio de restricción NdeI al inicio de la secuencia. Para la obtención del vector hospedero, se modificó pT4-cons-CAT.

Obtención del inserto: El primer paso consistió en diseñar el oligonucleótido (cuadro 2, pág. 26).



Cuadro 2. Oligonucleótido para construir pT4-CAT. Se diseñó el oligonucleótido NdeCAT2Cn, para amplificar el inicio del gen *cat* con codón de inicio.

Una vez sintetizado el oligonucleótido, se llevó a cabo una reacción de PCR para amplificar el gen *cat*. (diagrama 1.H, pág. 27). Así, a partir del plásmido pT4-cons-CAT como templado, los oligonucleótidos NdeCAT2Cn y Xho1CAT a 25 pmol c/u, se llevó a cabo la reacción a un volumen final de 100 μ l. El termociclador se programó en condiciones iguales a aquellas en las que se amplificó *cat* sin linker. Posteriormente, se purificó y se digirió con las enzimas NdeI y XhoI por 2 horas a 37°C, para nuevamente ser purificada.

Preparación del vector: El plásmido templado pT4-cons-CAT, fue sometido a una triple digestión con NdeI, BamHI y XhoI: ya que sus sitios de restricción abarcan desde el inicio de la secuencia consenso hasta el final de CAT, incluyendo el linker que los une (diagrama 1.G). El plásmido digerido fue purificado a partir de gel de agarosa.

Ensamblado de pT4-CAT: Se llevó a cabo la ligación del inserto de *cat* y el vector previamente digerido (conformado por el pT4 en sí) a temperatura ambiente por 3 horas, para luego purificarse (diagrama 1.I). Posteriormente, se transformó el vector resultante, se plaqueó y de las colonias crecidas se picaron 6 para inocularse en LB líquido + Km, durante toda la noche. Del cultivo se extrajo el plásmido para su secuenciación.

Secuenciación

De los plásmidos extraídos de las 6 clonas, sólo se mandaron a secuenciar 3 de ellas. Las rotuladas 1, 2 y 3 fueron secuenciadas con ayuda del oligonucleótido CAT100. Mediante análisis por Chromas Lite y SeaView, se encontró que la **clona 1** contenía el vector **pT4-CAT**.

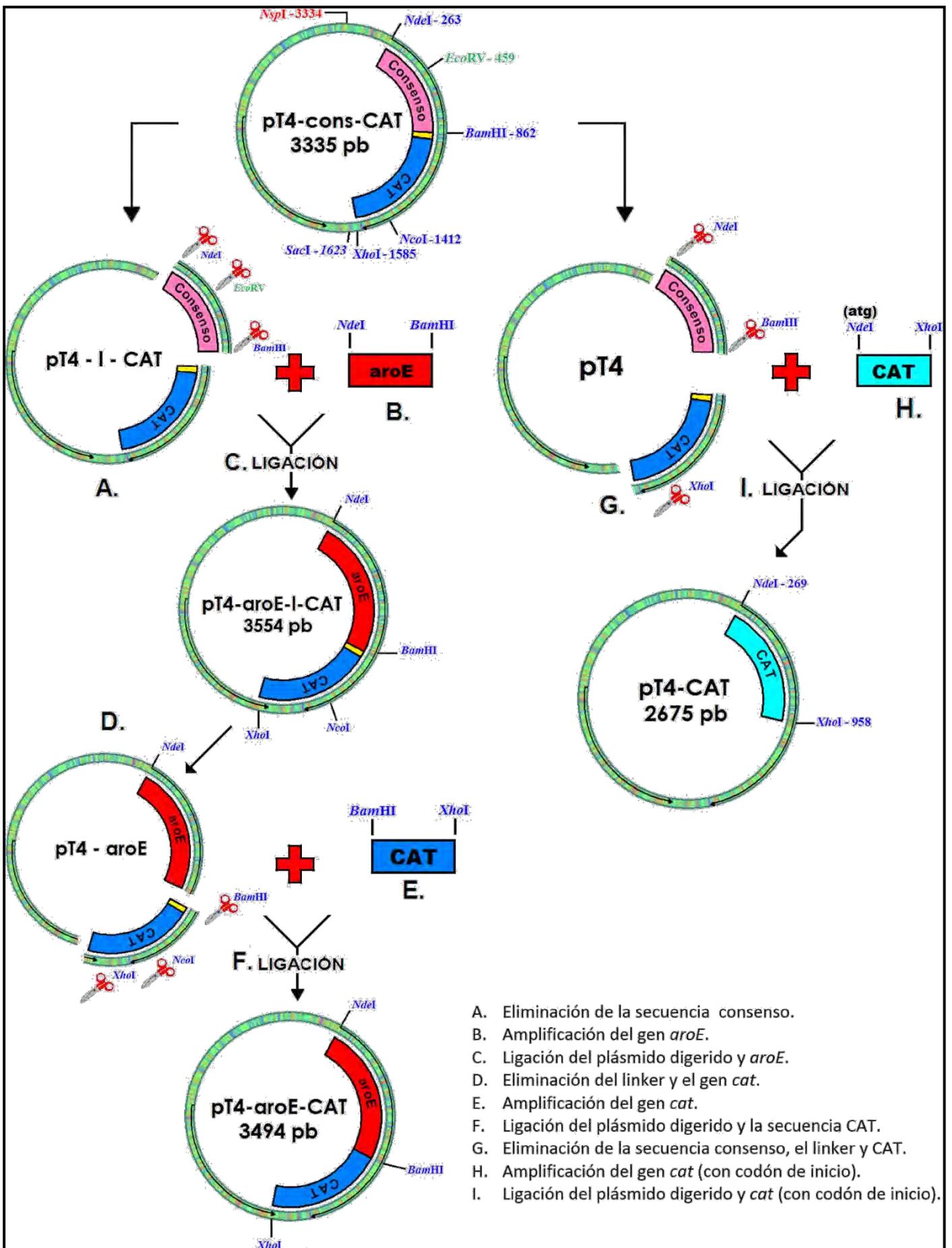


Diagrama 1. Construcción de vectores a partir de pT4-cons-CAT.

MIC DE LAS CONSTRUCCIONES: PLANEACIÓN Y ELABORACIÓN

El siguiente paso después de la construcción de los vectores **pT4-aroE-I-CAT**, **pT4-aroE-CAT** y el control positivo **pT4-CAT**, fue el conocer sus concentraciones mínimas inhibitorias. Para esto, se utilizó **pT4-PRAI** como control negativo, ya que carece de CAT y sólo puede crecer en presencia de Km, así como la construcción **pT4-cons-CAT**, como un segundo control positivo.

Diluciones: 2µl de cada uno de los plásmidos fueron incorporados a 60 µl de células electrocompetentes (p/vector), para su transformación. Después de recuperar las células, se plaquearon, y de las colonias crecidas se inocularon para su cultivo en 1ml de LB + 1 µl de Km, a 37° C. A partir de la primera hora se empezaron a medir las densidades ópticas. Una vez que los 5 cultivos se encontraron entre 2 y 3 OD's, se procedió a su dilución. Éstas fueron de 10⁻³, 10⁻⁴ y 10⁻⁵. Así, 1µl de cultivo se diluyó en 999µl de LB para obtener la dilución 10⁻³; de los 1000 µl resultantes se tomaron 100 µl para diluirse en 900 µl de LB y llegar a 10⁻⁴. Finalmente, de la primera dilución se tomaron 10 µl y se diluyeron en 990 µl de LB para conseguir 10⁻⁵.

Preparación de cajas: A partir del cálculo de las concentraciones de los antibióticos existentes en el laboratorio, se prepararon las cajas para el crecimiento de los cultivos diluidos. La siguiente tabla muestra las cajas y sus concentraciones para cada antibiótico.

MIC DE CONSTRUCCIONES: ANTIBIÓTICOS Y SUS CONCENTRACIONES

Número	CAJA	Concentración de Km	Concentración de Cm
1	LB	0 µg	0 µg
2	LB + Km	25 µg	0 µg
3	LB + Cm	0 µg	5 µg
4	LB + Cm	0 µg	10 µg
5	LB + Cm	0 µg	15 µg
6	LB + Cm	0 µg	20 µg
7	LB + Cm	0 µg	30 µg
8	LB + Cm	0 µg	40 µg
9	LB + Km + Cm	25 µg	5 µg
10	LB + Km + Cm	25 µg	10 µg
11	LB + Km + Cm	25 µg	20 µg
12	LB + Km + Cm	25 µg	40 µg

Tabla 1. Cajas utilizadas para el crecimiento de las construcciones en LB y Kanamicina, así como para los MICs de sólo Cloranfenicol y Cloranfenicol + Kanamicina.

Una vez hechas la diluciones y preparadas las cajas (ambas el mismo día), se tomaron 60µl de cada tubo de dilución y se colocaron, de manera ordenada, en una celdilla de ELISA. Con ayuda de una pipeta multicanal se fueron colocando gotas de 3µl en cada una de las cajas, mismas que posteriormente fueron selladas con parafilm e incubados a 30°C. Las colonias aparecieron a las 45 horas aproximadamente. Las imágenes de los MICs y los crecimientos en LB y Kanamicina, se observan en la sección de Resultados, pág. 42.

ITCHY: REQUISITOS Y PROYECCIONES

Como se mencionó anteriormente, esta técnica está basada en la habilidad de controlar tanto la tasa como la direccionalidad de la digestión del ADN, por medio de la Exonucleasa III. Esta enzima remueve de manera progresiva los mononucleótidos del extremo hidroxil 3' de ADN bicatenario. Sus sustratos son los extremos 3' romos y los extremos 3' rezagados; sin embargo, los extremos 3' sobresalientes de más de 4 bases, son resistentes al corte y no es activa en ADN de una sola hebra.

Por consiguiente, los plásmidos de ADN circular que contienen los genes de interés en este caso *aroE* y *ydiB*, deben ser digeridos con enzimas tales que se originen extremos 5' sobresalientes en la zona del ADN a trincar. De esta manera, las 4 bases 3' sobresalientes en el extremo opuesto, protegen al vector restante de la degradación.

Debido a lo anterior, las construcciones pre-ITCHY con las secuencias a trincar, deben cumplir con una serie de características:

- Poseer diferentes genes de resistencia a antibióticos, así como diferentes orígenes de replicación.
- Tener 1 sitio de restricción en común, al final de las secuencias codificantes.
- Contener 2 pares de sitios de restricción diferentes en cada vector; el primer par, al principio de una de las secuencias blanco, y el segundo, al final de la otra secuencia de interés. Estos sitios deben generar un extremo 3' romo o 3' rezagado, susceptible de digestión por exonucleasa, y otro extremo 3' sobresaliente (de por lo menos 4 pb, resistente a la acción de la enzima) que proteja al plásmido de la degradación.

Así, la modificación del vector pT4-*aroE*-CAT y el diseño de la segunda construcción con el otro gen a recombinar por ITCHY, quedaron proyectados de la siguiente manera:

- KpnI, como el sitio en común para su ligación final.
- El extremo cohesivo que queda del sitio NdeI posterior a su digestión, como la zona de acción de la exonucleasa sobre pT4-*aroE*-CAT y que hidroliza en dirección al inicio de *aroE*.
- El extremo cohesivo que queda del sitio Nsp I posterior a su digestión y resistente a la acción de la exonucleasa sobre pT4-*aroE*-CAT.
- El extremo cohesivo resultante de la digestión del sitio EcoRI, como la zona de acción de la exonucleasa sobre pBSSK-*ydiB*, y que digiere en dirección al extremo terminal de *ydiB*.
- El extremo cohesivo resultante de la digestión del sitio PstI y resistente a la acción de la exonucleasa sobre pBSSK-*ydiB*.

Una vez truncadas las construcciones en sus respectivas secuencias por efecto de la exonucleasa, eliminadas las cadenas monocatenarias de ADN por la enzima Mung Bean, y rellenados los extremos para dejarlos romos, ambos vectores son digeridos con KpnI. En uno se liberará el inserto y en el otro, se generará la zona de unión al inserto.

A continuación se ilustra lo anterior:

REPRESENTACIÓN LINEAL DE ITCHY SOBRE pT4-aroE-CAT

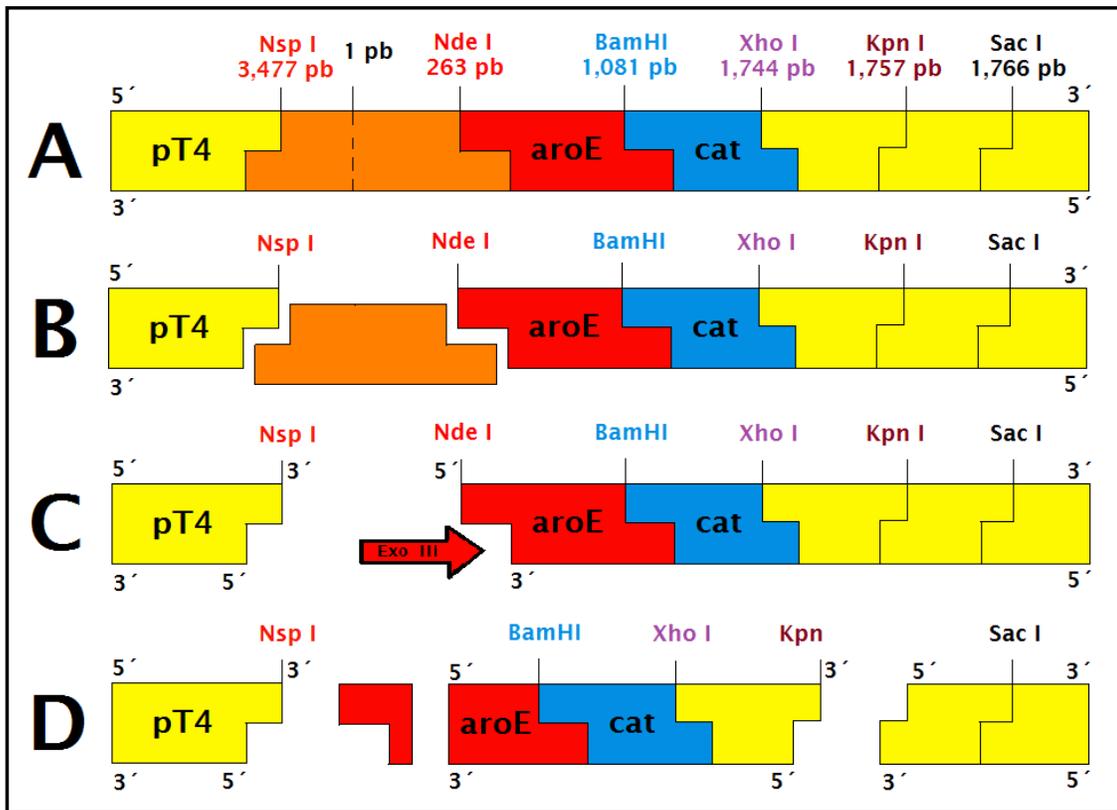


Fig.15. A. Vector pT4-aroE-CAT y sus sitios de restricción. B. Digestión doble con NspI y NdeI. C. Acción de la ExoIII sobre el extremo 3' rezagado del sitio NdeI digerido al inicio de *aroE* y protección del resto del vector de la degradación enzimática por el extremo 3' sobresaliente del sitio NspI digerido. D. Efecto simplificado de las enzimas Mung Bean y Klenow polimerasa (no representadas) que genera extremos romos sobre *aroE* y liberación del inserto truncado por digestión del vector con KpnI.

REPRESENTACIÓN LINEAL DE ITCHY SOBRE pBSSK-ydiB

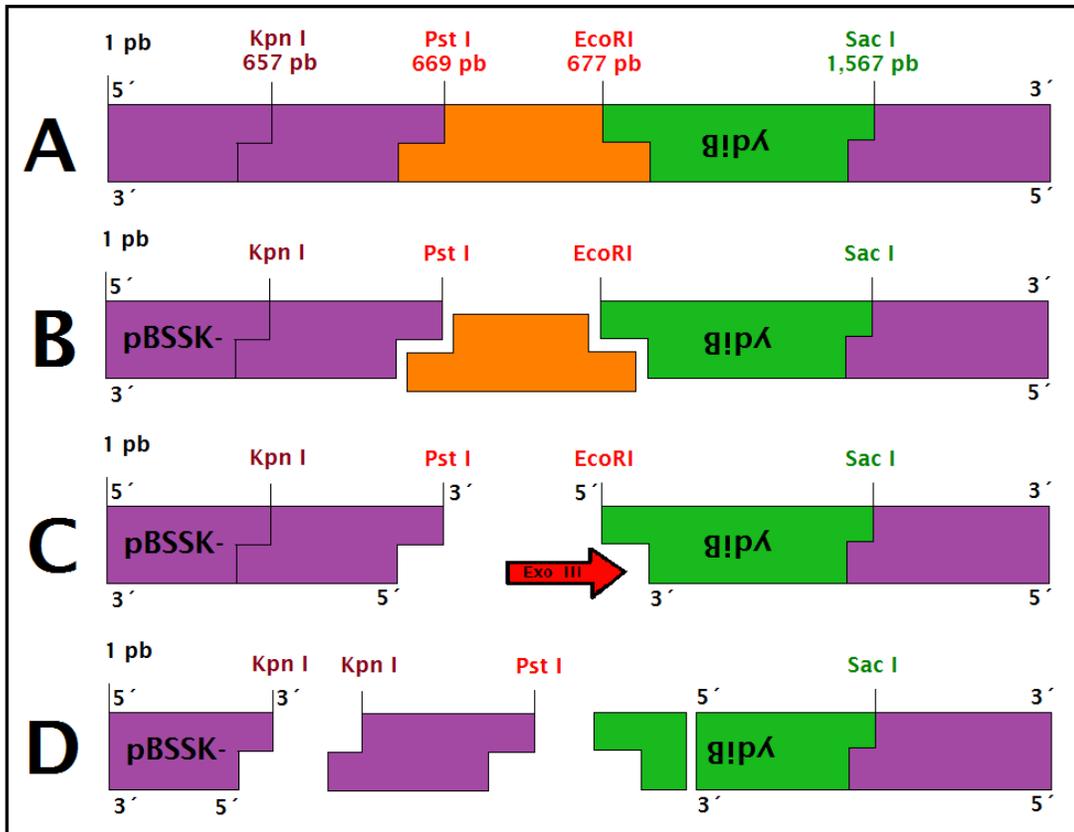


Fig.16. A. Vector pBSSK-ydiB y sus sitios de restricción. B. Digestión doble con PstI y EcoRI. C. Acción de la ExoIII sobre el extremo 3' rezagado del sitio EcoRI digerido al final de ydiB y protección del resto del vector de la degradación enzimática por el extremo 3' sobresaliente del sitio PstI digerido. D. Efecto simplificado de las enzimas Mung Bean y Klenow polimerasa (no representadas) que genera extremos romos sobre ydiB y creación de la zona de fusión al inserto truncado por digestión del vector con KpnI.

Finalmente, el inserto *aroE-cat* liberado, se liga en el mismo sitio KpnI en pBSSK-ydiB, formando así, una nueva construcción pBSSK-ydiB/aroE-CAT.

REPRESENTACIÓN LINEAL DEL VECTOR pBSSK-ydiB/aroE-CAT

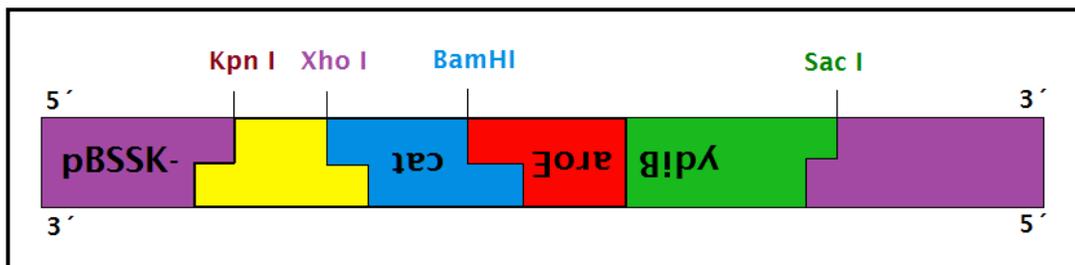
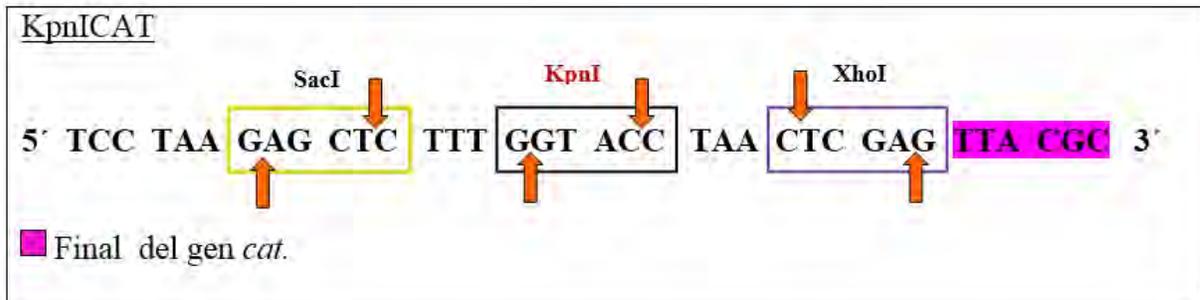


Fig.17. Vector ITCHY resultante, con sus respectivos sitios de restricción y el sitio en común KpnI.

En base a esta proyección se generaron los vectores pre-ITCHY: se modificó la construcción pT4-aroE-CAT y se construyó pBSSK-ydiB.

♣ MODIFICACIÓN DE pT4-aroE-CAT

Inserción del sitio común KpnI en *aroE*: Se diseñó un oligonucleótido para amplificar el gen *aroE* con el sitio común KpnI para ambas construcciones, al final de la secuencia *cat*, (cuadro 3).



Cuadro 3. Oligonucleótido para insertar KpnI en pT4-aroE-CAT. Diseño del oligonucleótido KpnICAT con los sitios de restricción SacI, KpnI y XhoI.

Una vez sintetizado el oligonucleótido, se llevó a cabo una reacción de PCR con el vector pT4-aroE-CAT como templado y los oligonucleótidos BamCAT y KpnICAT a un volumen final de 100µl.

- 1 ciclo de desnaturalización (95 °C por 5 min)
- 25 ciclos de amplificación (94 °C por 1 min, 55 °C por 1 min, 72 °C por 1 min)
- 1 ciclo de extensión final (72 °C por 10 min).

El producto de PCR se purificó, posteriormente se digirió con SacI y BamHI y se volvió a purificar (diagrama 2.B, pág. 38).

Preparación del vector: El vector pT4-aroE-CAT fue sometido a una digestión triple con BamHI, NcoI y SacI, para remover *cat*. El plásmido digerido fue purificado a partir de gel de agarosa (diagrama 2.A)

Ensamblado de pT4-aroE-CAT con sitio KpnI: El inserto *cat* con el sitio KpnI y el vector ya modificado, se ligaron a 37°C, toda la noche (diagrama 2.C). La ligación fue purificada y transformada en XL1Blue. Dicha transformación se plaqueó en LB+Km y de las colonias resultantes, se picaron 6 para crecimiento en LB líquido + Km, toda la noche. De las 6 clonas, rotuladas de la A a la F, se extrajo plásmido que a su vez fue sometido a digestiones diagnósticas. Aquellas clonas que liberaron inserto se mandaron a secuenciar.

Secuenciación

Como no se disponía de un oligonucleótido para secuenciar la parte final del gen *cat*, se consideró la zona entre los 50 y 60 pb a partir del final de su secuencia y se diseñó el siguiente:

pT4CATRev

5' GAC GGC CAG TGA ATT GTA ATA 3'

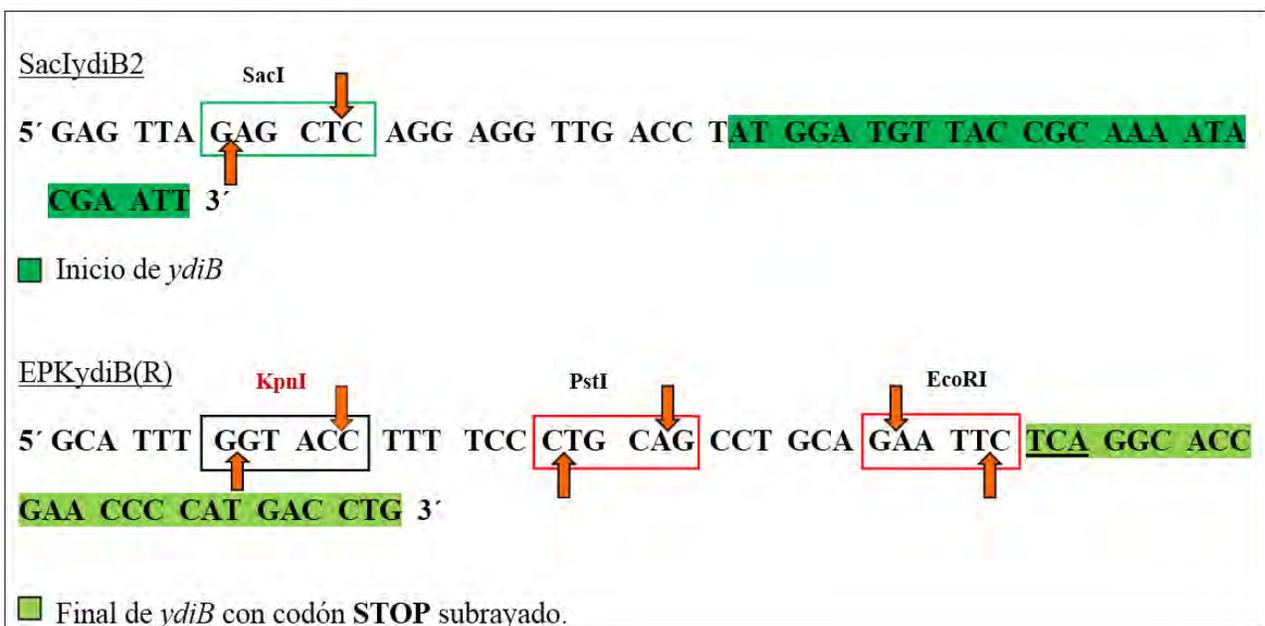
Cuadro 4. Oligonucleótido pT4CATRev para secuenciar final de *cat*.

Una vez sintetizado, se mandaron a secuenciar las clonas A, D y F con los oligonucleótidos CAT100 y pT4CATRev. Las secuencias se analizaron con los programas anteriormente mencionados y se encontró que la clona F tenía la construcción pT4-aroE-CAT con el sitio KpnI. Ésta fue rotulada como **pT4-aroECATKpnF** para su manejo en el laboratorio, sin embargo; ya en el ITCHY, se le hace mención únicamente como **pT4-aroE-CATk**.

Ya que esta construcción sería sometida al ITCHY, se decidió transformar, plaquear y picar 8 colonias para posteriormente extraer plásmido y purificarlo. Esto con el fin de contar con una cantidad abundante y concentrada del vector, a manera de reserva.

♣ CONSTRUCCIÓN DE pBSSK γ diB

Obtención del inserto: Se diseñaron 2 oligonucleótidos para amplificar *ydiB* (cuadro 5). SacI γ diB2 (F), con el sitio SacI, la secuencia Shine Dalgarno y la zona consenso que se localiza al inicio del gen; y EPK γ diB(R), con los sitios EcoRI (zona de acción de la ExoIII), PstI (sitio que una vez digerido junto con EcoRI, dejará extremos 3' sobresalientes que protegerán de la degradación al resto del vector) y el sitio en común, KpnI, todos estos al final del gen.



Cuadro 5. Oligonucleótidos SacI γ diB2 y EPK γ diB(R) para amplificar *ydiB*.

Ya sintetizados los oligonucleótidos, se llevó a cabo una reacción de PCR para amplificar *ydiB* con los sitios SacI, KpnI, PstI y EcoRI. Ésta reacción incluyó los oligonucleótidos EPK_{ydiB} y SacY_{ydiB2} a 30 pmol c/u y 3 colonias frescas de XL1Blue; el volumen final fue de 100µl.

- 1 ciclo de desnaturalización (95 °C por 10 min).
- 5 ciclos de amplificación (94 °C por 1 min, 50 °C por 1 min, 72 °C por 1 min).
- 20 ciclos de extensión final (94 °C por 1 min, 55 °C por 1 min, 72 °C por 1 min).

El producto de las reacciones se purificó a partir de un gel de agarosa. Posteriormente se llevó a cabo una digestión doble del gen con las enzimas KpnI y SacI, y esta misma se volvió a purificar (diagrama 2.F, pág. 38).

Preparación del vector: El plásmido pBSSK⁻, ya existente, se sometió a una triple digestión con las enzimas KpnI, EcoRI y SacI, con el fin de remover las 102 pares de bases del vector que se encuentran entre los sitios KpnI y SacI, donde se insertaría *ydiB* (diagrama 2.E).

Ensamblado de pBSSK⁻ydiB: Ya que se tenía el inserto de *ydiB*, se llevó a cabo una ligación con el vector pBSSK⁻ previamente preparado para tal fin (diagrama 2.G). Dicha reacción se incubó a 16 °C toda la noche, para posteriormente ser purificada, transformada, plaqueada; y de las colonias crecidas después de 40 horas, escoger las más pequeñas para ser picadas. Esta manera de “selección” se basó en la hipótesis de que aquellas de crecimiento más lento, eran colonias que experimentaban mayor dificultad en adaptarse debido a la presencia del vector con el inserto. Así, se picaron varias colonias para su cultivo y consiguiente extracción de plásmido.

Los plásmidos obtenidos, fueron sometidos a digestiones combinadas con las enzimas SacI, PstI y KpnI a manera de diagnóstico. De aquellas clonas que soltaron inserto, se mandaron a secuenciar 2.

Secuenciación:

Estas 2 clonas se sometieron a una primera secuenciación con los oligonucleótidos T7 y T3 (disponibles en la Unidad de Secuenciación) para corroborar los sitios insertados y posteriormente, a una segunda secuenciación con los oligonucleótidos M13F y M13R, para observar el estado del inserto y una mayor parte del vector. La zona de apareamiento para el oligonucleótido T7(F) en el vector pBSSK⁻ydiB, corresponde al sector comprendido entre las 38 y 57 pb, localizadas después del codón de paro en *ydiB*; mientras que para T3(R), ésta corresponde a las 33 y 53 pb, ubicadas antes del codón de inicio de *ydiB*. Para M13F, la zona de apareamiento se ubica en el área comprendida entre las 84 y 100 pb situadas después del codón de paro de *ydiB*, y para M13R, las 83 y 106 pb localizadas antes del codón de inicio del mismo gen.

Una vez analizadas las secuencias, se confirmó la presencia del inserto en ambas construcciones.

Igualmente como se hizo para el vector pT4-aroE-CATk, a partir de la construcción pBSSK⁻ydiB, se decidió transformar, plaquear en LB+Amp y picar colonias para posteriormente cultivarlas en medio líquido con Amp, extraer plásmido y purificarlo. Así, se generó una SOLUCIÓN CONCENTRADA para dicho vector.

Cuantificación de ADN: Los vectores fueron sometidos a una cuantificación de ADN por absorbancia a 260 A.

Digestiones pre-Exonucleasa: Ya calculada la concentración a la cual se encontraban los vectores, y confirmada ésta como la requerida para iniciar el ITCHY, se llevaron a cabo los cortes que dejarían la zona blanco para la Exonucleasa III. Así, un volumen considerable de ambos vectores se sometió a digestión: pT4-aroE-CATk fue digerido con NdeI y NspI (diagrama 2.D, pág. 38), mientras que pBSSK γ diB se digirió con EcoRI y PstI (diagrama 2.H). Ambas digestiones, divididas cada una en volúmenes más pequeños para optimizar la reacción, y a 37°C por 12 horas. Estas reacciones fueron purificadas y una parte de ellas cargadas en un gel de electroforesis, mediante el cual se visualizó la linearización de los vectores.

♣ MONTAJE DE CONDICIONES PARA DIGESTIÓN CON EXONUCLEASA III

Las condiciones para digerir el ADN con ExoIII son críticas en la generación de la biblioteca truncada, por lo que la precisión en la preparación de las enzimas y los buffers, es crucial para la adecuada digestión del ADN. De igual manera, y debido a que la actividad de la Exonucleasa III es muy susceptible a fluctuaciones de temperatura (como ya se ha mencionado), ésta variable también fue controlada de cerca durante todo el experimento. Respecto a lo anterior, Ostermeier recomienda que el tubo con la construcción a truncar se mantenga abierto y a una temperatura de 22° C durante el muestreo para evitar el calentamiento por manejo manual repetido, por lo que durante el presente protocolo, esto fue adaptado con ayuda de termocicladores que fueron programados para mantener la muestra a una temperatura constante (22° C u otra específica para cada prueba).

En cuanto a los buffers utilizados durante el ITCHY, la preparación de cada uno de ellos se encuentra en el Apéndice páginas 87 y 88. Cabe mencionar que como también se contaba con el buffer de la enzima exonucleasa de la marca *Biolabs*, se hicieron pruebas de digestión con ambas soluciones para determinar con mayor precisión la actividad de la enzima en cada uno de ellos.

De esta manera, se llevaron a cabo varias pruebas en las cuales se varió el volumen de la enzima, la temperatura, los buffers y el tiempo de reacción, para conocer el estado y la actividad de la Exonucleasa III.

Pruebas

En una primera prueba, se prepararon 16 tubos de reacción con el plásmido pBSSK γ diB previamente digerido, NaCl a 1M, buffer de ExoIII (8 con solución amortiguadora de Biolabs y 8 con la preparada) y agua tetradestilada a un volumen final de 30 μ l. Ya dispuestas las reacciones, se colocaron en el termociclador a la temperatura respectiva, durante 5 minutos, para equilibrarlas y posteriormente agregarles a cada una, 100 unidades de ExoIII (1 μ l), misma que se mezcló por unos segundos con las mezclas para iniciar el conteo de tiempo. Ya concluidos los respectivos minutos de acción de la enzima, se agregaron 180 μ l del Buffer STOP en frío para todas y cada una de las preparaciones y se volvieron a mezclar, para finalmente purificarse como productos de PCR. Los muestreos se hicieron en 2 temperaturas, 4°C y 22° C, y en 4 tiempos: 0 (como control), 1, 2.5 y 5 minutos.

Posteriormente, las reacciones purificadas fueron incubadas durante 30 minutos a 30°C, 5 μ l de Buffer Mung Bean a 10X y 1 μ l de la nucleasa Mung Bean. Las reacciones se purificaron a su vez, como productos de PCR.

A esta prueba, le siguieron otras en las que se seguía variando la temperatura, el tiempo (desde 0 a 3, 5 a 9, e incluso de 10 a 30 minutos), las soluciones amortiguadoras (buffer de Biolabs o el preparado en el laboratorio), el volumen de muestreo (de 1 a 3 μ l) y, la concentración y volumen de la exonucleasa III; sin embargo, como no se obtuvieron los barridos de ADN indicativos de una librería exitosamente truncada, se compró una enzima nueva y se continuó con las pruebas.

Con la enzima nueva, se llevó a cabo otra prueba con el buffer preparado y 1 μ l de ExoIII sin diluir (200 unidades), a 22°C y 1, 2.5, 5, 10, 20 y 30 minutos como tiempos de muestreo, sobre el vector pBSSK γ diB. Se arrojaron “barridos” que sugerían un acercamiento a los cortes esperados. Posteriormente, se hicieron unas cuantas pruebas más en las que se completaban los pasos con Mung Bean y Klenow, a manera de familiarizarse con la metodología.

Una vez que se encontraron las condiciones adecuadas y se determinó la tasa aproximada de digestión de la ExoIII, así como de la nucleasa Mung Bean y la enzima Klenow (que también fueron sometidas a pruebas de concentración, tiempo y temperatura), se procedió al ITCHY.

♣ ITCHY

Obtención de librerías truncadas

Se preparó una serie de reacciones por separado para los plásmidos pT4-aroE-CATk y pBSSK γ diB, previamente digeridos. Primeramente se sometieron a digestión por Exonucleasa III, de cuyas reacciones se fueron tomando alícuotas cada determinado tiempo para luego ser incorporadas en el Buffer STOP, a baja temperatura, para detener la digestión. Posteriormente se purificaron como productos de PCR, para luego someterlas a una segunda digestión por endonucleasa Mung Bean con el fin de eliminar el ADN de una hebra, resultante de la digestión por exonucleasa. Luego de inactivar esta última enzima, se les agregó el fragmento Klenow junto con una mezcla de dNTP's para el rellenado. Una vez inactivada esta enzima, pT4-aroE-CATk y pBSSK γ diB fueron sometidas a una última digestión con KpnI con el fin de liberar el inserto truncado y preparar la zona de inserción del gen en el vector, respectivamente. El procedimiento completo se encuentra en Resultados, página 45.

Ligación de insertos y vectores truncados

A partir del vector digerido y dividido en 2 grupos, y el inserto truncado, se llevaron a cabo 2 reacciones de ligación. Se utilizó ligasa (400,000 U) y PEG 8000 al 50%, para optimizar la ligación.

Controles de ITCHY

Ya obtenidas las ligaciones de las librerías truncadas, se seleccionaron los controles. Los vectores involucrados fueron los siguientes:

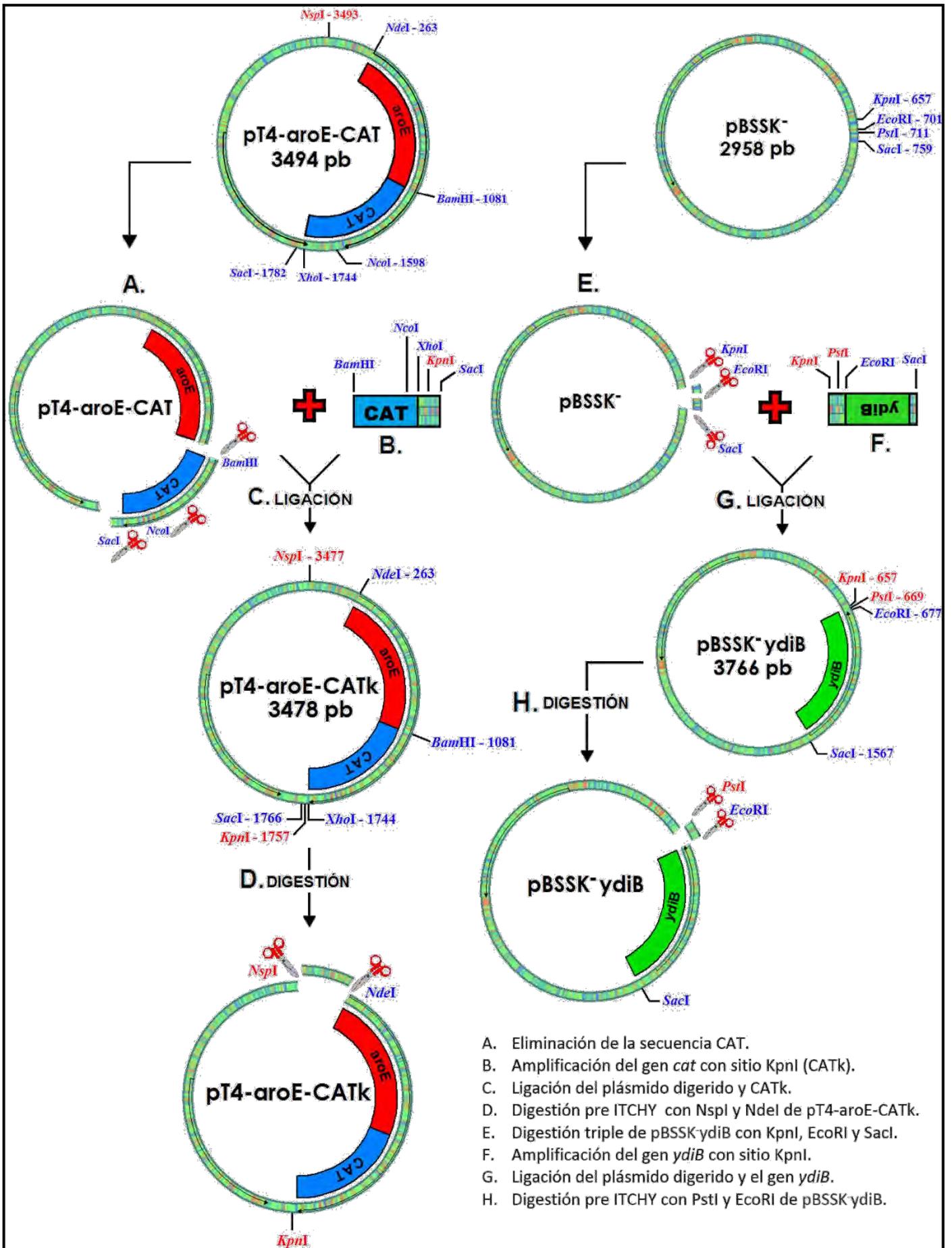
- La librería truncada de pBSSK γ diB.
- El vector pBSSK γ diB con doble digestión.
- El vector pT4-aroE-CATk con digestión sencilla.
- El vector pBSSK γ diB sin digerir.

Estos vectores se dividieron en 2 grupos: aquellos sometidos a ligación y los que no. En la sección de Resultados (tabla 2, pág. 47), se presenta una tabla detallada de los mismos.

Transformación de las ligaciones ITCHY, sus controles y elaboración de MICs

Los ITCHYs y los controles fueron sometidos a 2 vueltas de transformación en XLIBLue o MC1061, dependiendo el caso, y plaqueados en cajas con sus antibióticos respectivos. De las colonias crecidas, se picaron, se reestriaron y se volvieron a picar para crecerlas en medio LB líquido con antibiótico y purificarles plásmido. Posteriormente, se llevó a cabo una batería de PCRs y digestiones para seleccionar las clonas con inserto. Dichas clonas se secuenciaron y a partir de ellas, se generó otro set de clonas a partir de las cuales ya se elaboraron los MICs.

Los MICs se llevaron a cabo de manera similar a los MICs de las construcciones, sólo que en este caso y debido al número de clonas resultantes, se dividieron en 2 grupos: el rojo y el azul, se utilizaron los vectores pT4-CAT y pBSSK⁺ y diB como controles, y se manejó el antibiótico Ampicilina en vez de Kanamicina. Los detalles se encuentran en la sección de Resultados, página 66.



- A. Eliminación de la secuencia CAT.
- B. Amplificación del gen *cat* con sitio *KpnI* (CATk).
- C. Ligación del plásmido digerido y CATk.
- D. Digestión pre ITCHY con *NspI* y *NdeI* de pT4-aroE-CATk.
- E. Digestión triple de pBSSK-ydiB con *KpnI*, *EcoRI* y *SacI*.
- F. Amplificación del gen *ydiB* con sitio *KpnI*.
- G. Ligación del plásmido digerido y el gen *ydiB*.
- H. Digestión pre ITCHY con *PstI* y *EcoRI* de pBSSK-ydiB.

Diagrama 2. Construcción de vectores pre - ITCHY.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Importancia de la secuencia de unión para el reportero de plegamiento

Como ya se ha mencionado, en el presente proyecto se generaron una serie de construcciones con la finalidad de conocer la importancia de la secuencia de unión (compuesta por 39 pares de bases) en el reportaje de expresión del gen *aroE*, por la proteína CAT. Los vectores construidos fueron:

- **pT4-*aroE*-I-CAT**: El gen *aroE* está fusionado a la secuencia de CAT mediante el “linker” (sin codón de inicio). Ver figura 18.
- **pT4-*aroE*-CAT**: El gen *aroE* se encuentra fusionado directamente a la secuencia de CAT (sin codón de inicio). Ver figura 19.
- **pT4-CAT**: El plásmido sólo contiene a la secuencia de CAT sin linker y con su codón de inicio. Es un plásmido control. Ver figura 20.

MAPA CIRCULAR DE pT4-*aroE*-I-CAT

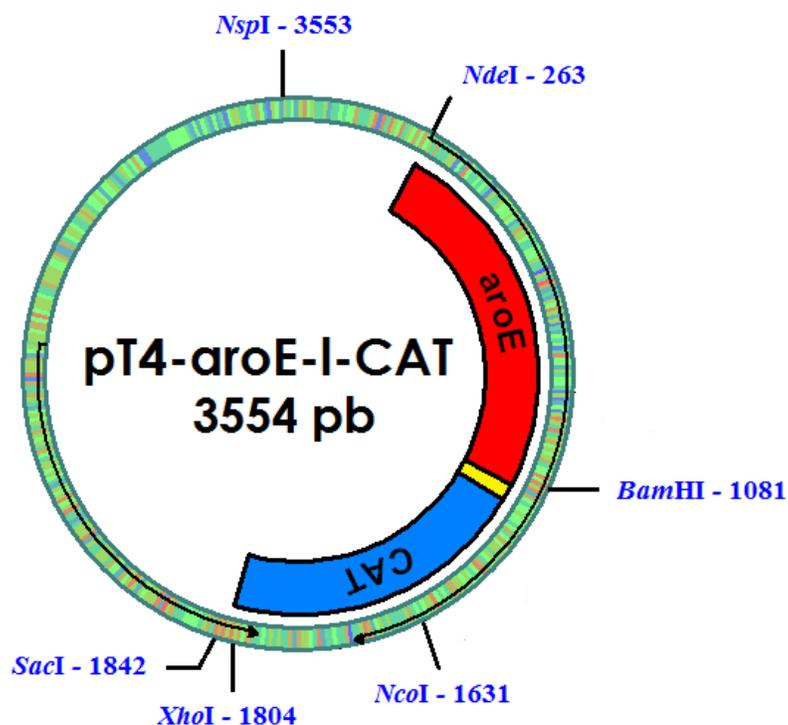


Figura 18. Plásmido generado a partir de la digestión de la secuencia consenso de pT4-cons-CAT y la ligación del vector resultante con el gen *aroE*. En amarillo, el conector.

MAPA CIRCULAR DE pT4-aroE-CAT

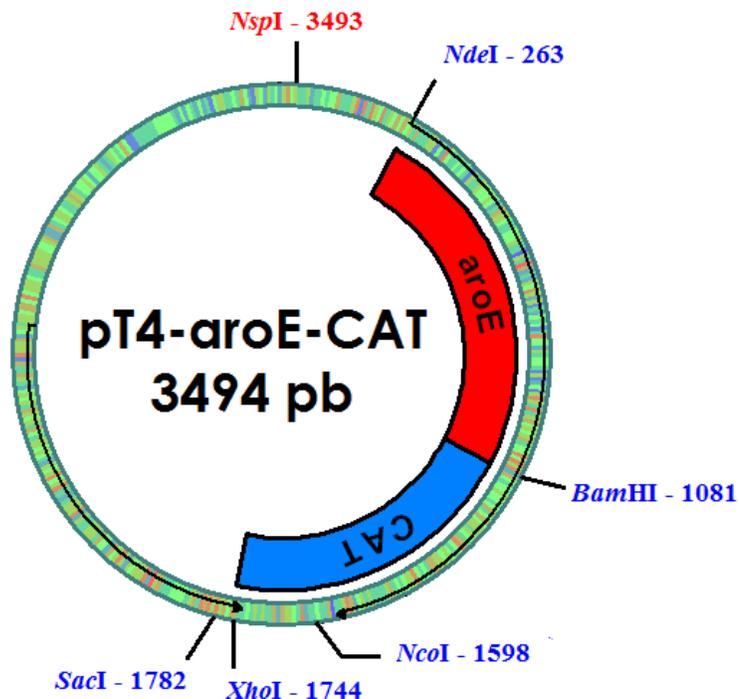


Figura 19. Plásmido construido a partir de la digestión del linker y la secuencia *cat* de pT4-aroE-I-CAT, y la ligación del vector resultante con el gen *cat*, sin codón de inicio ni cola de histidinas.

MAPA CIRCULAR DE pT4-CAT

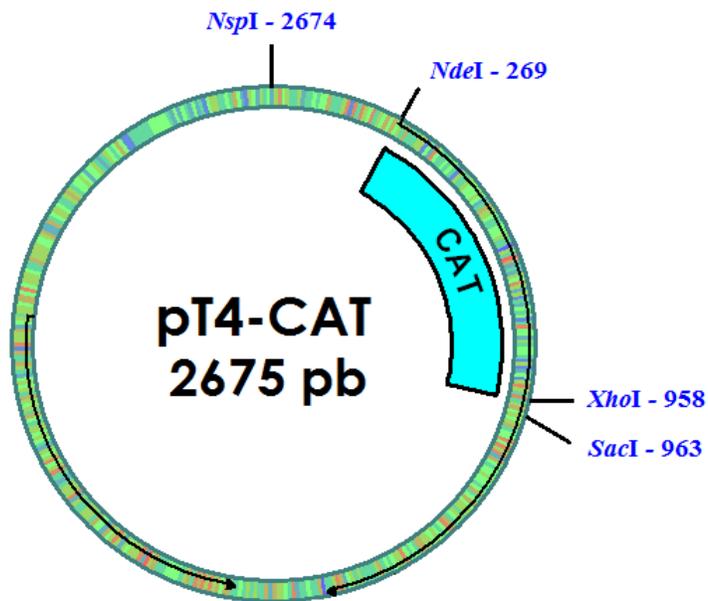


Figura 20. Plásmido generado a partir de la digestión de *aroE*, el linker y *cat* de pT4-cons-CAT, y la ligación del vector resultante con el gen *cat* con codón de inicio y sin cola de histidinas.

Así, las construcciones obtenidas fueron analizadas y comparadas, junto con los vectores **pT4-cons-CAT** (secuencia consenso de PRAI ligada a CAT por la misma secuencia de unión) y **pT4-PRAI** (ambas previamente existentes en el laboratorio), mediante la determinación de la resistencia al Cloranfenicol de las células transformadas, dada por la presencia o ausencia del conector unido a CAT, y en base al cálculo de sus Concentraciones Mínimas Inhibitorias (MIC).

Las imágenes completas de los patrones de crecimiento en LB y Kanamicina; así como de los MICs elaborados para las construcciones **pT4-aroE-CAT**, **pT4-aroE-l-CAT** y los controles **pT4-cons-CAT**, **pT4-CAT** y **pT4-PRAI**, se presentan en la página siguiente.

CRECIMIENTO EN LB

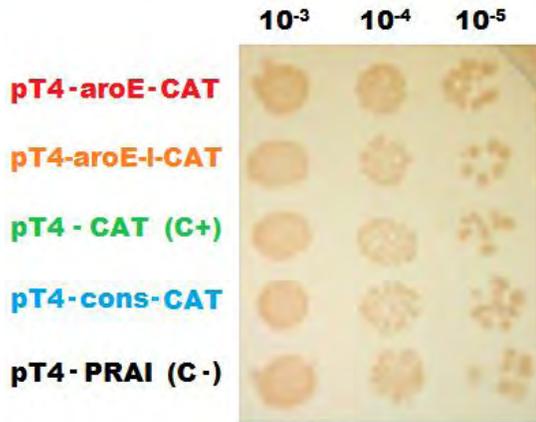


Fig. 21. Crecimiento en medio LB

CRECIMIENTO EN KM

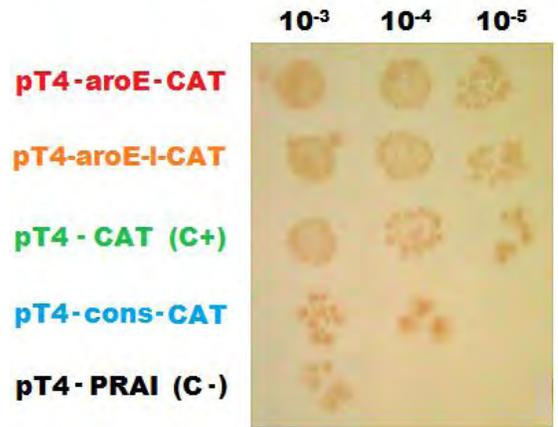


Fig. 22. Crecimiento en Km [25µg/ml]

MIC DE CONSTRUCCIONES EN CM

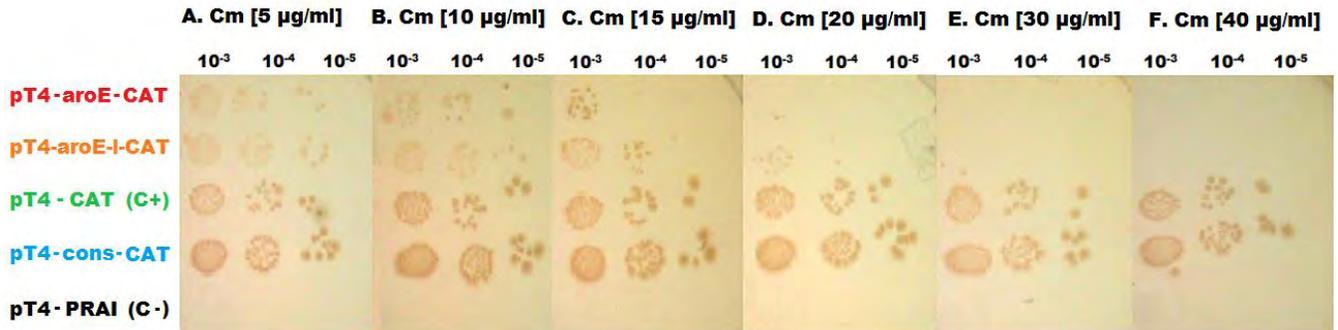


Fig. 23. A. Cm [5 µg/ml] B. Cm [10 µg/ml] C. MIC con Cm [15 µg/ml] D. Cm [20 µg/ml]
E. Cm [30 µg/ml] F. Cm [40 µg/ml]

MIC DE CONSTRUCCIONES EN KM Y CM

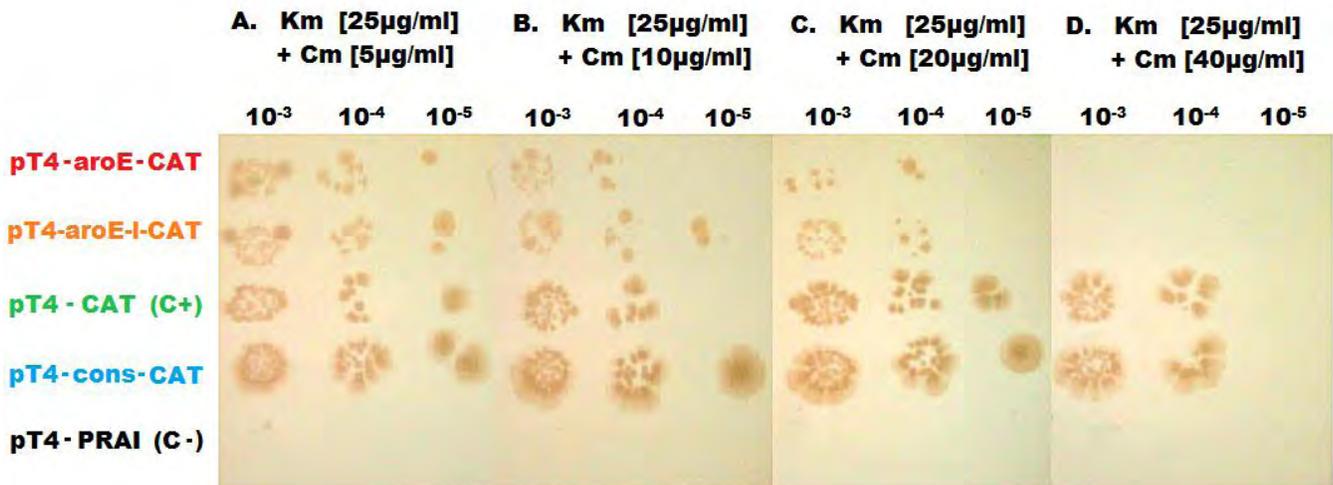


Fig.24. A. Km [25 µg/ml] + Cm [5 µg/ml] B. Km [25 µg/ml] + Cm [10 µg/ml]
C. Km [25 µg/ml] + Cm [20 µg/ml] D. Km [25 µg/ml] + Cm [40 µg/ml]

En base a los resultados obtenidos, podemos decir que a diferencia de lo que se esperaba, la presencia del linker entre *aroE* y la secuencia de la proteína reportera CAT, juega un papel importante en la resistencia a Cm. A diferencia de aquella construcción sin linker, la construcción pT4-aroE-1-CAT presentó valores ligeramente mayores de resistencia. En un inicio se pensó que la ausencia de la secuencia de unión promovería una mayor dependencia de CAT a la secuencia a la que se encontrara fusionada, lo que no se esperaría ante la presencia de un conector; sin embargo, los resultados indican lo contrario. Probablemente se deba a cuestión de espacio. Dado que la CAT es una proteína homotrimérica, quizá la secuencia de unión le ofrece una mayor movilidad y flexibilidad conformacional. Si el trímero se encuentra muy cercano al dominio Rossmann, como ocurre en la construcción pT4-aroE-CAT, es posible que la limitación espacial no le permita desempeñar de manera óptima su papel como reportero de plegamiento.

Por otro lado, no se presentaron problemas con los controles. En el caso de las cepas transformadas con el control negativo pT4-PRAI, no se observó crecimiento en presencia de Cm (figuras 23 y 24, pág. 42); éstas sólo crecieron en LB y en LB+Km debido al cassette de resistencia que presenta el plásmido pT4 (figuras 21 y 22). En el caso de los controles positivos pT4-CAT y pT4-cons-CAT, se observó que poseen resistencias al Cm muy similares, aunque pT4-CAT es ligeramente menos resistente que el vector que contiene a la secuencia consenso de PRAI (figura 23). Sin embargo, en relación a las construcciones con *aroE*, la resistencia de pT4-CAT al Cm es superior. Este resultado coincide con la teoría expuesta anteriormente. Como en este caso CAT no se encuentra fusionada a ningún dominio, excepto al vector, el trímero se puede mover en libertad, confiriéndole así una actividad óptima reflejada en una alta resistencia al Cm.

Por último, cabe mencionar que los valores del MIC para Cm disminuyen en todas las construcciones cuando se encuentran en presencia de Kanamicina de manera concomitante. Esto se debe a que a las células hospederas les resulta más difícil adaptarse a un medio donde deben degradar dos antibióticos simultáneamente (en vez de sólo uno) para subsistir.

Construcción de quimeras con el método ITCHY

Como se detalló en la sección de Materiales y Métodos, las construcciones a trincar debían cumplir con una serie de requisitos para que la recombinación de las secuencias de interés presentes en ellas, pudiera ser factible mediante el método ITCHY (pág.30 y 31). Así, bajo dichas condiciones, se generaron los vectores pT4-aroE-CATk y pBSSK⁺ydiB.

A continuación se presentan los mapas circulares de ambas construcciones:

MAPA CIRCULAR DE pT4-aroE-CATk

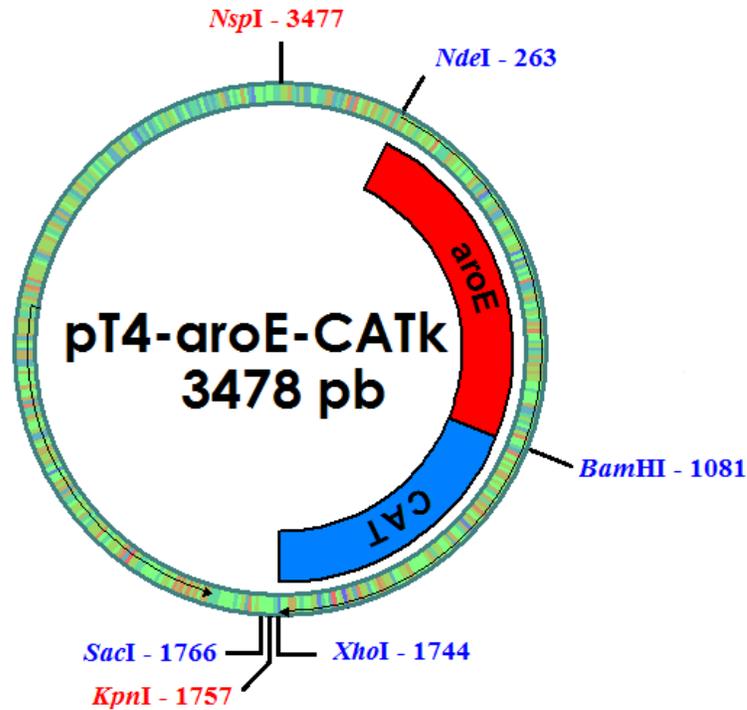


Figura 25. Plásmido pre-ITCHY que contiene el gen a truncar *aroE*. El sitio KpnI, en común con el plásmido pBSSK-ydiB, se encuentra al final del gen *cat*.

MAPA CIRCULAR DE pBSSK-ydiB.

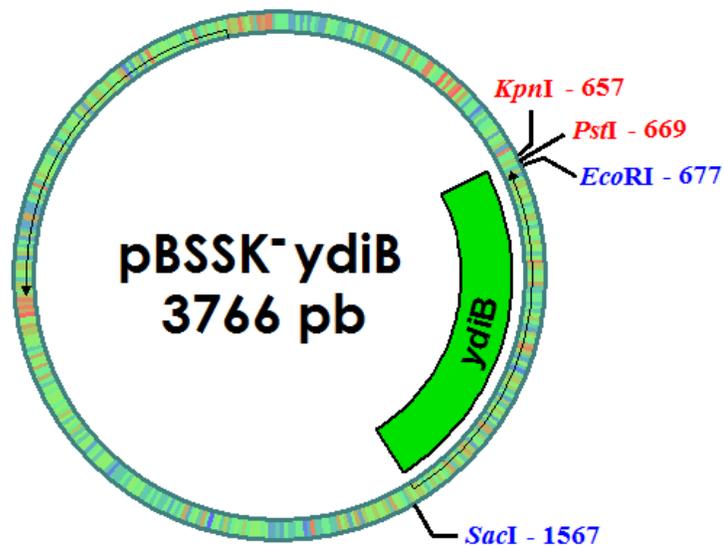


Figura 26. Plásmido pre-ITCHY que contiene el gen a truncar *ydiB*. El sitio KpnI, en común con el plásmido pT4-aroE-CATk, se encuentra al final de la secuencia de interés.

Una vez obtenidas las construcciones pT4-aroE-CATk y pBSSK-ydiB, y montadas las condiciones de digestión para la Exonucleasa III con sus respectivas pruebas, (todos estos procedimientos desarrollados en la sección de Materiales y Métodos, pág. 32-36), se procedió a la generación de las librerías truncadas.

Obtención de librerías pBSSK-ydiB truncadas (VECTOR)

Se prepararon 6 reacciones, cada una con el plásmido pBSSK-ydiB previamente digerido, NaCl 1M, el buffer preparado y agua tetradestilada a un volumen final de 60µl. Una vez equilibradas las reacciones durante 5 minutos a 22°C en el termociclador, se les agregó 2µl de ExoIII (200 unidades). Cada 15, 20 y 30 segundos, se tomaron alícuotas de 1µl y 2 µl de las muestras respectivas para ser incorporadas y mezcladas en 180µl del Buffer STOP en frío para detener la digestión.

De manera alterna, se decidió preparar 3 reacciones más con los mismos elementos y tiempos pero esta vez, tomando 3µl de las muestras.

Los productos de las 2 digestiones fueron purificados como productos de PCR, para posteriormente adicionarles 5µl del Buffer Mung Bean 10X y 1µl de la nucleasa Mung Bean (10 unidades) para eliminar el ADN de una hebra. Esta nueva reacción se incubó a 30°C por 30 minutos, y se purificó de igual manera. A su vez, esta muestra fue equilibrada a 37°C por 5 minutos, para luego agregarle 10µl de dNTP's MIX a 0.125mM y 10 µl de la enzima Klenow Mix para efectos de polimerización (rellenado). La reacción se incubó otros 5 minutos más a la misma temperatura para finalmente ser inactivada por temperatura a 72°C por 20 minutos, y por último enfriada a 4°C. Posteriormente, fue sometida a una digestión con KpnI a 37°C, toda la noche, sitio donde se ligaría el inserto y nuevamente se purificó como producto de PCR.

Obtención de librerías pT4-aroE-CAT truncadas (INSERTO)

Se prepararon 6 reacciones, cada una con el plásmido pT4-aroE-CATk previamente digerido, el buffer elaborado, NaCl 1M y agua tetradestilada a un volumen final de 60µl. Una vez equilibradas las reacciones durante 5 minutos a 22°C en el termociclador, se les agregó 2µl de ExoIII (200 unidades). Cada 15, 20 y 30 segundos, se tomaron alícuotas de 1 y 2 µl de las muestras respectivas para ser incorporadas y mezcladas en 180µl del Buffer STOP en frío. Una séptima reacción se repitió bajo las mismas condiciones y con muestreo cada 15 segundos, pero con alícuotas de 3 µl. Ésta fue añadida a la primera con el tiempo de muestreo correspondiente.

Todas las reacciones fueron purificadas como productos de PCR para luego, ser incubadas con 5µl del Buffer Mung Bean 10X y 1µl de la nucleasa Mung Bean (10 unidades) a 30°C por 30 minutos. Después de purificarse de igual manera, las muestras se equilibraron a 37°C por 5 minutos, para después añadirles 10µl de dNTP's MIX a 0.125mM y 10 µl de la enzima Klenow. Las mezclas se incubaron otros 5 minutos más a la misma temperatura, se inactivaron a 72°C por 20 minutos, y por último se enfriaron a 4°C. Posteriormente, se sometieron a una digestión con KpnI a 37°C

durante toda la noche, para remover el inserto truncado del vector, y se purificó como producto de PCR.

Ligación de insertos y vectores previamente truncados

Previo a la ligación, se corrió un gel de agarosa para observar los vectores y los insertos. En base a lo anterior, se decidió juntar todas las reacciones correspondientes al inserto y centrifugarlas (Inserto CEN). También se mezclaron las de los vectores para dar lugar a 2 grupos: uno con las reacciones de tiempos 15 y 30 (Vec-15/30), y otro con las reacciones de todos los tiempos muestreados (Vec-15/20/30).

Se llevaron a cabo 2 reacciones de ligación.

ITCHY A

- 1.5 µl Vec-15/20/30
 - 20 µl Inserto CEN
 - 4 µl Buffer ligasa 10X
 - 4 µl PEG 8000 al 50%
 - 3 µl ligasa (400,000 U)
 - 7.5 µl ddH₂O
-
- 40 µl TOTALES

ITCHY B

- 12 µl Vec-15/30
 - 20 µl Inserto CEN
 - 4 µl Buffer ligasa 10X
 - 4 µl PEG 8000 al 50%
 - 3 µl ligasa (400,000 U)
-
- 43 µl TOTALES

Ambas ligaciones se realizaron a 37 °C, dejando las mismas toda la noche. Posteriormente se purificaron hasta un volumen final de 12 µl.

Una vez obtenidas las ligaciones ITCHY, se procedió a la selección de los controles para conocer datos importantes del experimento, como el número de vectores enteros que no se digirieron, la eficiencia de la ligasa empleada, el porcentaje de religado y la eficiencia de transformación de las construcciones. De esta manera, se dividieron en 2 grupos: aquellos que fueron sometidos a una reacción de ligación y los que no. De los vectores ligados, se encuentran las 2 librerías ITCHY del vector pBSSK-ydiB (el vector previamente digerido con EcoRI/PstI, ExoIII, Mung Bean, relleno con Klenow y digerido con KpnI), el mismo vector doblemente digerido sólo con EcoRI y PstI; y por último el vector pT4-aroE-CATk, digerido solamente con NdeI.

En cuanto a los vectores que no fueron ligados, se encuentran las 2 librerías ITCHY del vector pBSSK-ydiB, el mismo vector digerido doblemente y sin digerir; y por último, la construcción pT4-aroE-CATk, con digestión sencilla. A continuación, se presenta una tabla de las ligaciones ITCHY y sus controles.

CONSTRUCCIONES ITCHY Y CONTROLES

Presencia/Ausencia Ligasa	ITCHYs y CONTROLES	Especificaciones
CON LIGASA	ITCHY A	Vec-15/20/30 + Inseto CEN
	ITCHY B	Vec-15/30 + Inseto CEN
	Librería vector B1	pBSSK ⁻ truncado (15/20/30)
	Librería vector B2	pBSSK ⁻ truncado (15/30)
	Vector con 2 cortes	pBSSK ⁻ y diB dig (EcoRI/PstI)
	Vector con 1 corte	pT4-aroE-CATk dig (NdeI)
SIN LIGASA	Librería vector 1	pBSSK ⁻ truncado (15/20/30)
	Librería vector 2	pBSSK ⁻ truncado (15/30)
	Vector con 2 cortes	pBSSK ⁻ y diB dig (EcoRI/PstI)
	Vector con 1 corte	pT4-aroE-CATk dig (NdeI)
	Vector SIN cortes	pBSSK ⁻ y diB

Tabla 2. En la presente tabla se muestran los controles utilizados, si fueron ligados previamente o no y los detalles de los mismos.

Transformación de vectores ITCHY y de sus respectivos controles (1ª VUELTA)

Así, una vez seleccionados los controles, se procedió a la transformación de los vectores. Tanto los ITCHYs como los controles fueron electroporados a 1.8KV en XL1Blue. Luego de su recuperación por 1 hora a 30°C, 1µl, 10µl y 50µl de los ITCHYs y 10 µl y 50µl de los controles respectivamente, fueron plaqueados en cajas con Amp o Km según el caso e incubados a 30°C. El crecimiento de las células transformadas se presenta a continuación:

CRECIMIENTO DE COLONIAS ITCHY Y CONTROLES (1ª VUELTA)

No.	CON LIGASA	ANTIBIÓTICO	UFC en 1µl	UFC en 10 µl	UFC en 50µl	COLONIAS SATÉLITES	
1	ITCHY A	Amp	N.O	N.O	35	♣♣♣	
2	ITCHY B	Amp	N.O	1	22	♣	
3	Librería vector B1	Amp		N.O	25	♣♣	
4	Librería vector B2	Amp		8	200	♣♣	
5	Vector con 2 cortes	Amp		1	59	♣♣♣	
6	Vector con 1 corte	Km		>200	Incontables	N.O	
SIN LIGASA							
7	Librería vector B1	Amp			N.O	N.O	N.O
8	Librería vector B2	Amp		N.O	N.O	N.O	
9	Vector con 2 cortes	Amp		N.O	13	♣♣	
10	Vector con 1 corte	Km		21	87	N.O	
11	Vector SIN cortes	Amp		Incontables	Incontables	N.O	

Tabla 3. La tabla muestra el número de UFC que crecieron para cada vector transformado, en relación al volumen que se plaqueó y la presencia o ausencia de ligasa para cada uno. De igual manera, el símbolo ♣, indica si se encontró un número bajo, medio o alto de colonias satélite. N.O indica "No se observaron".

En base a lo anterior, se seleccionaron 58 colonias en total correspondientes a las ligaciones ITCHY; la mayoría pertenecientes al ITCHY A, ya que en el caso del ITCHY B, no se apreciaron colonias en 1µl de plaqueo y apenas se observó 1 UFC para los 10µl.

Respecto a las librerías truncadas sometidas a ligasa, se puede decir que para B1, los resultados fueron congruentes, ya que con ligasa se identificaron 0 y 25 colonias en 10 μ l y 50 μ l respectivamente, mientras que sin ligasa, no se observó ninguna colonia a simple vista, ni satélites. Para la librería B2, tampoco se apreciaron colonias en ningún volumen plaqueado ni tampoco satélites en ausencia de ligasa, aunque para ésta misma, el número de colonias observadas aumentó 8 veces en relación a la librería B1 (de 0 a 8 y de 25 a 200 colonias), presentando además una cantidad media de satélites. También, resulta interesante observar 200 colonias para B2 aún en presencia de ligasa, dado que, posteriormente a un tratamiento con Klenow, los extremos que quedan, resultan en extremos rasurados y no cohesivos, dificultando aún más el religado. Es probable que este aumento en la relación entre B1 y B2, y éste alto número de posibles ligaciones, se deba a que para el conteo se consideraron erróneamente varias colonias que eran realmente satélites, ya que ambas librerías fueron expuestas de manera simultánea a los mismos pasos y las mismas enzimas a través de su truncamiento.

En cuanto al vector con 2 cortes, con y sin ligasa, se encontró una disminución de las colonias observadas sin ligasa, así como de los satélites: de 1 a 0 colonias y de 59 a 13 en 10 μ l y 50 μ l, respectivamente. Esta disminución, también se observó de manera acentuada en relación al vector con 1 solo corte, con 21 y 87 colonias sin presencia de ligasa, contra 200 e incontables colonias para el mismo con ligasa. La marcada diferencia entre ambas construcciones, aún en presencia de ligasa, se debe a que el universo de corte en una digestión doble, es mayor que en un vector con un solo corte. Éste último posee una mayor probabilidad de religado ya que en los extremos del plásmido linearizado queda el mismo sitio, que puede ser religable; lo que no ocurre con tanta facilidad cuando se hacen cortes en 2 sitios de restricción diferentes, como es el caso del vector control doblemente digerido con EcoRI y PstI. El plásmido sin cortes, por su lado, mostró un crecimiento esperado como control positivo y sin presencia de satélites, indicativo de una buena eficiencia de transformación en el experimento.

Por último, la presencia de varias colonias satélite pudo ocurrir por la degradación del antibiótico, mediado por las bacterias resistentes, de manera que, luego de cierto tiempo de permanencia del cultivo en la incubadora, aquellas bacterias que no incorporaron el plásmido y que por lo tanto no son resistentes al antibiótico, comenzaron a crecer. Estas colonias se ven más pequeñas que las colonias resistentes y crecen cerca de ellas, y algunas veces, pueden ser confundidas con aquellas colonias transformadas exitosamente.

Purificación de clonas por reestriado

Las 58 colonias que crecieron en las cajas ITCHY A e ICTHY B, se picaron y reestriaron en cajas con LB+Amp a 30°C, toda la noche; y de las 37 que crecieron, 16 fueron picadas al azar para crecerlas en LB líquido + Amp. Se extrajo plásmido y se realizaron varias reacciones de PCR para corroborar la presencia del inserto.

PCRs para las clonas ITCHY (1ª Vuelta)

Cada reacción de PCR se llevó a cabo con las mismas cantidades de Taq polimerasa, buffer, plásmido y dNTP's. Lo único que cambió además de la cantidad de ddH₂O para aforar, fueron los oligonucleótidos agregados y los volúmenes de éstos. Todas las reacciones fueron corridas en el termociclador con el siguiente programa y con los siguientes oligonucleótidos:

- 1 ciclo de desnaturalización (95 °C por 10 min).
- 5 ciclos de amplificación (94 °C por 1 min, 55 °C por 1.5 min, 72 °C por 1.5 min).

- 20 ciclos de extensión (94 °C por 1 min, 55 °C por 1.5 min, 72 °C por 2 min).
- 1 ciclo final (72°C por 10 minutos).

Así, los cálculos para los productos de PCR esperados para cada caso, consideran como peso máximo, el de las secuencias intactas. Lo anterior, deja implícito que se pueden presentar productos con pesos iguales o menores a los calculados, dependiendo de si hubo truncamiento o no en los genes de interés.

PCR 1. Con los oligonucleótidos M13F y M13R. Amplifica lo que se encuentra entre los sitios de múltiple clonación de la quimera pBSSK-ydiB/aroECATk. Tamaño del producto: **2538 pb o menos.** Ver figura 28.

PCR 2. Con los oligonucleótidos SacYdiB2 y CAT100. Amplifica las 111 pb iniciales de *cat*, *aroE* y *ydiB*, del mismo vector. Tamaño del producto: **1820 pb o menos.** Ver figura 29.

PCR 3. Con los oligonucleótidos BamHIAroE y M13R. Amplifica *aroE*, *ydiB* y parte del vector cerca del inicio de *ydiB*. Tamaño del producto: **1796 pb o menos.** Ver figura 30.

PCR 4. Con los oligonucleótidos BamHIAroE y SacYdiB2. Amplifica *aroE* y *ydiB*. Tamaño del producto: **1709 pb o menos.** Ver figura 31, pág. 51.

PCR 5. Control A. Con el plásmido pBSSK-ydiB sin truncar como templado y los oligonucleótidos BamHIAroE y M13R, como control negativo. Ver figura 32.

PCR 6. Control B. Con el plásmido pBSSK-ydiB sin truncar como templado y los oligonucleótidos M13F y M13R. Amplifica *ydiB*, como control positivo. Tamaño del producto: **1073 pb.** Ver figura 32.

PCR 7. Control C. Con el plásmido pBSSK-ydiB sin truncar como templado y los oligonucleótidos SacYdiB2 y CAT100, como control negativo. Ver figura 32.

Para la observación y cálculo de los productos de PCR de nuestro interés, se utilizó un marcador que permite visualizar bandas que van desde las 100 pb, hasta las 10,000 pb. Por lo general, el marcador correspondió al primer carril de las electroforesis en gel; aunque en algunos casos, se utilizó varias veces dentro de un mismo gel para facilitar la observación de los fragmentos.

A continuación, se presenta el marcador utilizado y las fotos de los geles con las reacciones de PCR resultantes.

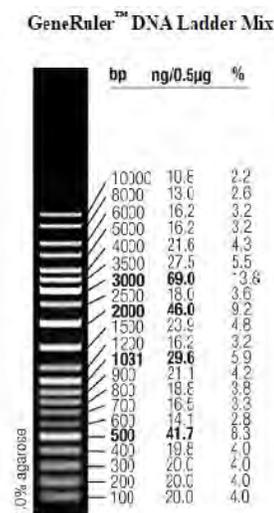


Fig. 27. Marcador molecular GeneRuler DNA Ladder Mix

PCR 1

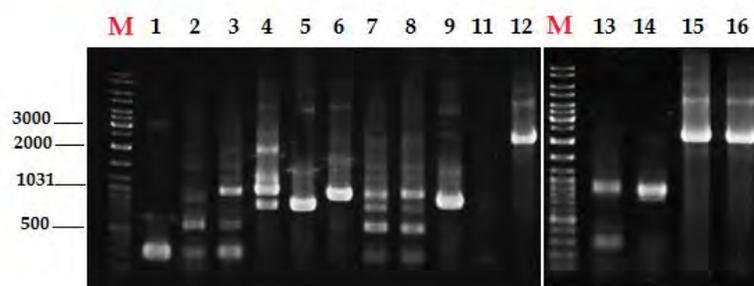


Fig. 28. Electroforesis en gel del PCR 1. Productos de PCR de las clonas 1 a la 16 (excepto clona 10), amplificados con los oligonucleótidos M13F y M13R. En todos los carriles, a excepción del correspondiente a la clona 11, se pueden observar bandas. Sólo las clonas con un peso de entre 2,538 pb (valor esperado para este PCR) y 1,200 pb aproximadamente, resultan de interés; es decir, clonas 12, 15 y 16. Con la letra M se indican los carriles correspondientes al marcador.

PCR 2

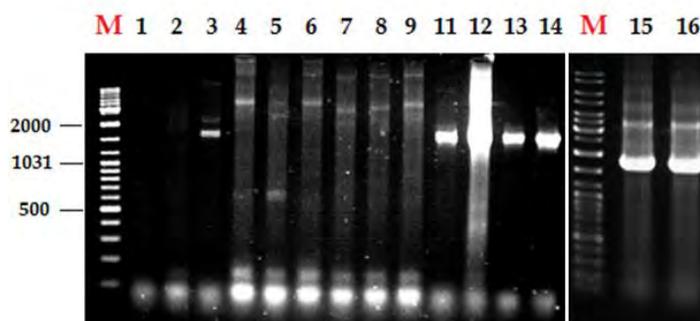


Fig. 29. Electroforesis en gel del PCR 2. Productos del PCR 2 de las clonas 1 a la 16 (excepto clona 10), amplificados con los oligonucleótidos SacYdiB2 y CAT100. Sólo se observan bandas para las clonas 3, 11, 12, 13, 14, 15 y 16. Todas ellas se encuentran entre las 1,500 y 2000 pb, consistentes con el valor esperado de 1,820 pb aproximadas para el producto de este PCR. Con la letra M se indican los carriles correspondientes al marcador.

PCR 3

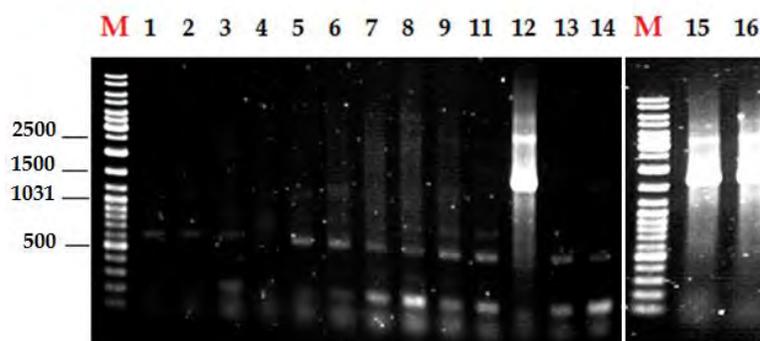


Fig. 30. Electroforesis en gel de PCR 3. Corresponde a los productos del PCR 3 de las clonas 1 a la 16 (excepto clona 10) amplificados con los oligonucleótidos BamHIAroE y M13R. Sólo se observan bandas para las clonas 12, 15 y 16 ubicadas entre las marcas de las 2,000 y 1,500 pb. Las 3 clonas se ven más cercanas a ésta última banda, consistente con las 1,796 pb o menos, esperadas para el producto de este PCR. Con la letra M se indican los carriles correspondientes al marcador.

PCR 4

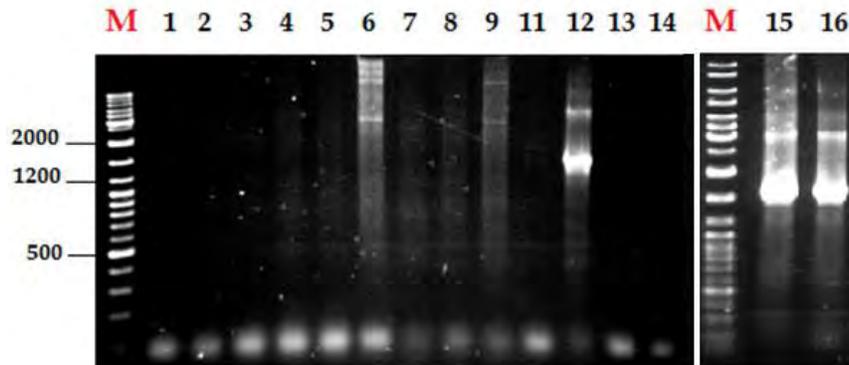


Fig. 31. Electroforesis en gel del PCR 4. Se observan los productos del PCR 4 de las clonas 1 a la 16 (excepto clona 10) amplificadas con los oligonucleótidos BamHIAroE y SacYdiB2. Únicamente se observan bandas para las clonas 12, 15 y 16. Todas ellas se ubican cercanas a la marca de las 1,500 pb o ligeramente por encima de ésta, coincidente con el valor de 1,709 pb o menos, esperadas para el producto del PCR 4. Con la letra M se indican los carriles correspondientes al marcador.

PCR CONTROLES

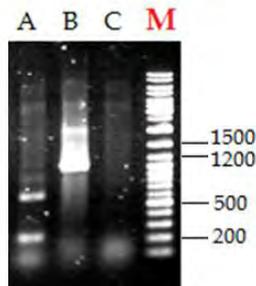


Fig. 32. Electroforesis en gel de PCR CONTROLES. Se muestran los productos de PCR de los CONTROLES A, B y C. En todos ellos se utilizó el plásmido pBSSK-ydiB como templado y diferentes pares de oligonucleótidos. A y C, corresponden a los controles negativos; mientras que B, amplificado con el par M13F/M13R, corresponde al control positivo. La banda de éste último, se ubica entre las marcas de las 1,200 pb y las 1,031 pb; congruente con el valor de 1,073 pb esperadas para este PCR. Con la letra M se indican los carriles correspondientes al marcador.

En la figura 28, se encontró que para el PCR 1 se observaron bandas para todos los carriles, excepto para la clona 11. Algunas de ellas, no indican precisamente producto de PCR y su presencia puede deberse a varios factores, incluyendo pero no limitado a: degradación o contaminación del ADN, hibridación de los oligonucleótidos en zonas inespecíficas del templado, o dimerización de los cebadores. A pesar de que aquellas pertenecientes a las clonas 5, 6, 9, 12, 14, 15 y 16, se observan más claramente que el resto, sólo las clonas con un peso aproximado de 1,200 pb o más, resultan de interés; es decir, las clonas 12, 15 y 16.

Considerando que el peso máximo para este PCR es de 2,538 pb, aquellas por debajo de 1031 se descartan por indicar un exceso de digestión de las secuencias de interés (un valor menor se relacionaría de forma tentativa, al truncamiento de más de $\frac{3}{4}$ partes para ambos genes, *aroE* y *ydiB*).

En el caso de la figura 29 (pág. 50), correspondiente al PCR 2, se puede ver producto para las clonas 3, 11, 12, 13, 14, 15 y 16. Todas las bandas se encuentran entre las 1,500 y 2000 pb, consistentes con el valor esperado de 1,820 pb aproximadas para el producto de este PCR.

Por otro lado, en la figura 30 correspondiente al PCR 3, sólo se observa producto para las clonas 12, 15 y 16; al igual que para el PCR 4 (figura 31). Las bandas en ambos PCRs (e independientemente de la ondulación que se percibe en éstas) se encuentran ubicadas cercanamente a la marca de las 1,500 pb (clona 12), o ligeramente por encima de ésta y por debajo de las 2,000 pb (clona 15 y 16). Estos valores, son consistentes con las 1,796 pb o menos esperadas para el PCR 3, y las 1709 pb o menos, esperadas para el PCR 4, respectivamente.

En la figura 32 del PCR CONTROL, en los carriles A y C y, correspondientes a los controles negativos, se observa una ausencia de producto como resultado de la amplificación del plásmido pBSSK⁺diB con los oligonucleótidos BamHIAroE/M13R y SacYdiB2/CAT100 respectivamente. En contraparte, el carril B, amplificado con el par M13F/M13R, corresponde al control positivo. En éste último se logra observar una banda ubicada por debajo de la marca de las 1,200 pb y cercana a la de 1,031 pb; congruente con el valor de 1,073 pb esperadas para este PCR. Los resultados de este PCR CONTROL, salieron como lo esperado.

Por último, cabe mencionar que, considerando todos los PCRs (independientemente de los oligonucleótidos empleados), sólo se observó producto de manera consistente, para las clonas 12, 15 y 16.

En base a los resultados obtenidos, se procedió a obtener la secuencia nucleotídica de estas 3 clonas.

1ª Secuenciación de vectores ITCHY

A partir de lo observado por electroforesis de los productos de PCR, se mandaron a secuenciar las clonas IT12, IT15 e IT16 con los oligonucleótidos CAT100 y M13R. Como se esperaba, las 3 clonas arrojaron ambas secuencias.

Las clonas se rotularon como **ITA-12**, **ITA-15** e **ITA-16**, para diferenciarlas de la segunda vuelta de transformación.

Doble selección de las clonas ITCHY por repicado (1ª vuelta)

Una vez secuenciadas aquellas clonas seleccionadas por producto de PCR, se llevó a cabo un proceso de doble selección de las mismas (figura 33, pág. 53). Dado que las clonas previamente transformadas con los vectores ITCHY lograron crecer en un medio con Ampicilina (a razón de la resistencia conferida a dicho antibiótico por el plásmido pBSSK⁺), se decidió llevar a cabo una segunda selección por cultivo en medio con Cloranfenicol; esta vez, para conocer la actividad del gen *cat* dentro de las construcciones ITCHY.

El proceso de “doble selección,” se aplicó para las clonas **ITA-12**, **ITA-15** e **ITA-16** previamente secuenciadas. Primeramente fueron transformadas en XL1Blue, y posteriormente se plaquearon 1µl, 5µl y 10µl en cajas con Amp [200µg/ml] y Cm [10µg/ml] + IPTG 0.5mM. La clona **ITA-12** fue la única que creció en ambos antibióticos. Una colonia de esta clona fue picada y repicada con palillo en 2 cajas con los antibióticos mencionados, para efectos de resultado.

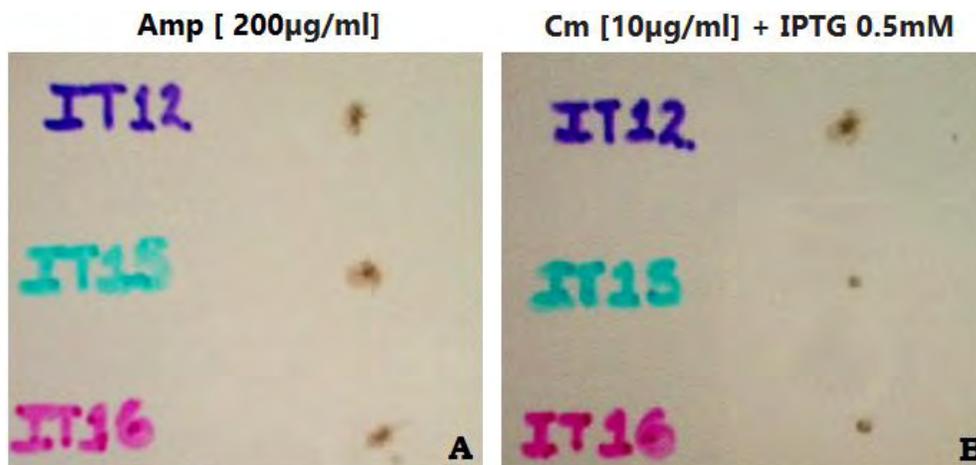


Fig. 33. En la figura A, se observa el crecimiento de las 3 clonas en Amp [200µg/ml], mientras que en la figura B, sólo se observa crecimiento de la clona ITA-12 en presencia de Cm [10µg/ml] + IPTG.

Los resultados de la secuenciación de **ITA-12**, se mencionan más adelante, junto con los de las quimeras resultantes de la segunda vuelta de transformación, (tabla 6, pág. 60).

En este punto, se decidió repetir el procedimiento con la finalidad de aislar un mayor número de clonas exitosamente transformadas con las construcciones ITCHY. A continuación se mencionan los pasos, los cambios y los detalles de esta segunda vuelta.

Transformación de vectores ITCHY y de sus respectivos controles (2ª VUELTA)

A partir de las ligaciones ITCHY A y B, y los controles correspondientes, se volvió a transformar. Esta vez, además de XL1Blue, se utilizaron células MC1061 (sólo para electroporar los ITCHYs), con la finalidad de aumentar la eficiencia de transformación. Dado que las clonas con productos de PCR consistentes pertenecían a las células transformadas con ITCHY B, se le dio prioridad a esta ligación para ser electroporada en las células MC1061.

El uso de ambos cultivos celulares para esta segunda vuelta (donados por Humberto Flores), permitió comparar la eficiencia de transformación entre XL1Blue y MC1061 para las ligaciones ITCHY dentro de éste evento (tabla 4, pág. 54), pero también con los resultados arrojados por las XL1Blue utilizadas durante la primera vuelta de transformación (tabla 3, pág. 47).

Vectores ITCHY: Luego de su recuperación por 1 hora a 37°C, 10µl (2X), 100µl(2X), 200µl y 300µl de los ITCHYs fueron plaqueados en cajas con Amp [200µg/ml] ó Cm [10 µg/ml+IPTG 0.5mM].

Los resultados fueron los siguientes:

CLONAS ITCHY: CRECIMIENTO EN XLIBLUE Y MC1061

	ITCHY A (XLIBLue)		ITCHY B (MC1061)	
	UFC en Amp	UFC en Cm	UFC en Amp	UFC en Cm
10	8	3	23	1
10'	7	N.O	24	2
100	480	32	787	150
100'	363	28	521	79
200	No se plaqueó para estos vol. en Amp.	104	No se plaqueó para estos vol. en Amp.	352
300		365		558

Tabla. 4. Clonas ITCHY, crecimiento en XLIBLue y MC1061. La tabla muestra el número de colonias transformadas con las clonas ITCHY que crecieron en los antibióticos Amp o Cm para las 2 cepas, XLIBLue y MC1061, en relación a los diferentes volúmenes de plaqueo.

Como se puede observar, hubo una mayor eficiencia de transformación de los vectores en las células MC1061 (en un orden de entre 1.4 veces, para el volumen de 100' µl en Amp y de 4.6 veces para el volumen de 300 µl en Cm) que en las células XLIBLue. Inclusive, aún después de que ambas fueron incubadas a las mismas condiciones de tiempo y temperatura, las colonias XLIBLue presentaron un tamaño mucho menor en comparación con las colonias MC1061. Esto se debe principalmente a la diferencia en la preparación y la calidad de las células electrocompetentes.

Respecto a los datos obtenidos en la primera transformación (tabla 3, pág. 47), se puede ver que mientras para el ITCHY A no se observaron colonias en 10 µl en Ampicilina, en esta segunda transformación (también en XLIBLue) y para el mismo volumen y antibiótico, se encontraron entre 7 y 8 colonias. De forma similar, para el ITCHY B de la primera vuelta, sólo se encontró una colonia en 10 µl del antibiótico Ampicilina, mientras que para la segunda vuelta de transformación (en células MC1061), crecieron entre 23 y 24 colonias, para el mismo volumen y antibiótico. Estos datos son indicativos de un drástico aumento en la eficiencia dentro del mismo tipo celular XLIBLue (aunque con fechas de elaboración diferentes), como entre los cultivos celulares XLIBLue y MC1061.

También, resulta evidente para esta segunda transformación, que existe un mayor número de colonias crecidas en el antibiótico Ampicilina que en Cloranfenicol. Esto puede ser debido a que la proteína CAT experimente problemas para reportar el plegamiento de la proteína AroE fusionada a YdiB, ya que por la misma fusión probablemente AroE no se esté plegando adecuadamente y esto se vea reflejado en una dificultad de la proteína CAT para degradar el Cloranfenicol. No así la Ampicilina, pues el cassette para dicho antibiótico se encuentra como parte del mismo vector pBSSK'. Por esta razón, se decidió llevar a cabo la “doble selección” con ambos antibióticos. Así, para esta segunda vuelta, se picaron colonias crecidas en Cm para repicarlas en medio sólido con Amp y viceversa, como más adelante se muestra en la página 56.

Controles: De igual manera, también se transformaron los controles de la primera vuelta en las células XLIBLue donadas. Una vez recuperadas en 37°C por 1 hora, se plaquearon 50 µl de cada uno en cajas con Amp [200µg/ml], Cm [10µg/ml] o Km [25µg/ml] según el caso, y se dejaron crecer a 30°C. Los resultados se presentan a continuación:

CRECIMIENTO DE COLONIAS CON CONTROLES ITCHY (2ª VUELTA)

Presencia/Ausencia Ligasa	CONTROLES	UFC en Amp o Km (50µl)	UFC en Cm (50µl)
CON LIGASA	Librería vector B1	26	N.O
	Librería vector B2	340	N.O
	Vector con 2 cortes	727	N.O
	Vector con 1 corte	Incontables	43
SIN LIGASA	Librería vector B1	15	N.O
	Librería vector B2	2	N.O
	Vector con 2 cortes	18	N.O
	Vector con 1 corte	526	2

Tabla 5. Relación de colonias XL1Blue crecidas en las cajas con los diferentes antibióticos, transformadas por segunda vez, con los diferentes vectores en presencia o ausencia de ligasa.

Como se esperaba, el número de las colonias crecidas en las cajas con Amp o Km para aquellos controles sin ligasa, fue mucho menor que para aquellos expuestos a ella. La librería del vector B1 con ligasa presentó casi el doble de colonias (26) que el mismo sin ligasa (15), mientras que esta proporción se elevó a 170 veces para la librería del vector B2, con 340 colonias contra sólo 2. En este caso, a pesar de que el vector fue sometido a digestiones repetidas durante su tratamiento con ExoIII, es posible que una parte mayor de la muestra, correspondiente al menor tiempo de truncado, haya permanecido intacta y por lo tanto, se facilitó su religado en presencia de la enzima de unión.

En cuanto a los vectores con 1 y 2 cortes, dicha tendencia se mantuvo. En el vector con 2 cortes y ligasa, se observaron 40 veces más colonias (727) que en aquel sin ligasa (18); mientras que para el vector con 1 corte y ligasa, no fue posible el conteo a simple vista ya que eran demasiadas en comparación con las 526 crecidas para el mismo vector sin la enzima. Este último valor, aunque también elevado, sigue siendo coherentemente menor en relación al dato de las 727 colonias transformadas con un vector doblemente digerido pero expuesto a ligasa. Esta enorme diferencia observada podría atribuirse (además de a la obvia ventaja que representa la presencia de dicha enzima) a un posible remanente del vector que no fue digerido con EcoRI ni con PstI. El porcentaje de vector que no se cortó con ninguna de las dos enzimas, pudo arrojar una cantidad considerable de vectores recircularizados en presencia de ligasa; sin embargo, no es lo que se espera, dado que las digestiones dobles reducen considerablemente esta posibilidad, por lo que es más probable que (debido al alto número de colonias), se haya cometido un error en el conteo.

Por otro lado, no se observa crecimiento en Cm de bacterias transformadas con pBSSK-ydiB o librerías con dicha construcción, como lo esperado; mientras que el vector con digestión sencilla (pT4-aroE-CATk) presentó crecimiento de 43 y 2 colonias, con y sin ligasa respectivamente.

Por último, y en relación a los primeros controles electroporados y plaqueados en 50 µl (tabla 3, pág. 47), esta segunda transformación no arroja cambios importantes para la librería B1 con ligasa (con 25 colonias iniciales contra 26 de la segunda vuelta). Tampoco para el vector con 1 corte y ligasa (en ambas se observan incontables colonias); ni para éste mismo vector sin ligasa (13 UFC iniciales contra 18 finales).

Sin embargo, para las librerías B1 y B2 sin ligasa, en cuya primera transformación no se observó crecimiento, en esta ocasión se encontraron 15 y 2 colonias, respectivamente. Este aumento en la población de UFC, se hizo más notable para el vector con digestión sencilla sin ligasa, con 526 colonias contra 87 (6 veces más) y el vector con doble digestión con ligasa, con 727 contra 59 (12 veces más). En menor medida, y con un aumento aproximado de 1.7 veces más UFC, se encuentra la librería B2 (de >200 a 340 colonias). Además de los posibles errores en el conteo de las colonias (anteriormente mencionados), este aumento en la cantidad de UFC observadas para cada control

puede ser dado, en parte, por la eficiencia de transformación de las células competentes utilizadas, atribuida a la calidad inherente de las mismas y a la reciente fecha y forma de elaboración.

En general, los datos obtenidos, sugieren una buena y mejorada eficiencia de transformación.

Doble selección de las clonas ITCHY por repicado (2ª vuelta)

Se picaron 120 colonias de las cajas de Amp [200µg/ml] y se repicaron con palillo en cajas de Cm [10µg/ml + IPTG 0.5mM]. De igual manera, 240 colonias de las cajas de Cm [10µg/ml + IPTG 0.5mM] se repicaron en cajas de Amp [200µg/ml]. Se incubaron a 30 °C hasta que se observó crecimiento. De las 320 colonias, 7 crecieron del primer grupo (grupo azul) y 13 del segundo (grupo rojo). Se rotularon de la siguiente manera:

- **GRUPO AZUL:** ITB-29, ITB-35, ITB-62, ITB-84, ITB-87, ITB-98 e ITB-116.
- **GRUPO ROJO:** ITB-7, ITB-8, ITB-12, ITB-17, ITB-45, ITB-53, ITB-58, ITB-91, ITB-93, ITB-95, ITB-103, ITB-111 e ITB-114.

PCRs para las construcciones ITCHY (2ª Vuelta)

Las 20 colonias fueron sometidas a 2 reacciones de PCR con los siguientes oligonucleótidos y bajo las mismas condiciones que las dadas en la 1ª vuelta de transformación del ITCHY.

- PCR 1. Con los oligonucleótidos BamHIAroE y SacYdiB2 (que amplifica desde el final de *aroE*, hasta el inicio de *ydiB*). Tamaño del producto: **1,709 pb o menos**, porque no se sabe cuántas bases se truncaron en cada gen. Ver figuras 34 y 35, página 57.
- PCR 2. Con los oligonucleótidos SacYdiB2 y CAT100 (que amplifica desde las 100 pb del inicio de CAT, *aroE*, hasta el inicio de *ydiB*). Tamaño del producto: **1,820 pb**, abierto a variación, por las mismas razones previamente mencionadas. Ver figuras 36 y 37, página 58.

Los PCR se corrieron junto con otras 2 reacciones con la clona ITA-12 y el vector pBSSK⁺ydiB para control positivo y negativo, respectivamente.

PCR 1 (GRUPO ROJO)

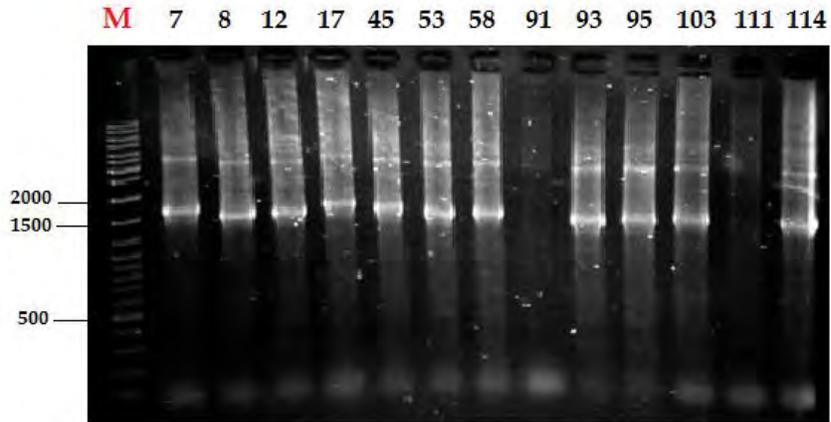


Fig. 34. Electroforesis en gel del PCR 1 para el grupo Rojo. Productos del PCR1 amplificados con los oligonucleótidos BamHIAroE y SacYdiB2. Se aprecian bandas en los carriles 2 al 8 correspondientes a las clonas ITB-7, ITB-8, ITB-12, ITB-17, ITB-45, ITB-53, ITB-58; así como en los carriles 10, 11, 12 y 14 para ITB-93, ITB-95, ITB-103 e ITB-114, respectivamente. En los carriles 9 y 13, propios de ITB-91 e ITB-111, no se observó producto de PCR. Todas las bandas se encuentran ubicadas en la marca de las 1,500 pb o ligeramente encima de ésta, consistente con el producto esperado de 1,709 pb o menos, para este PCR. Con la letra M se indica el carril correspondiente al marcador.

PCR 1 (GRUPO AZUL Y CONTROLES)

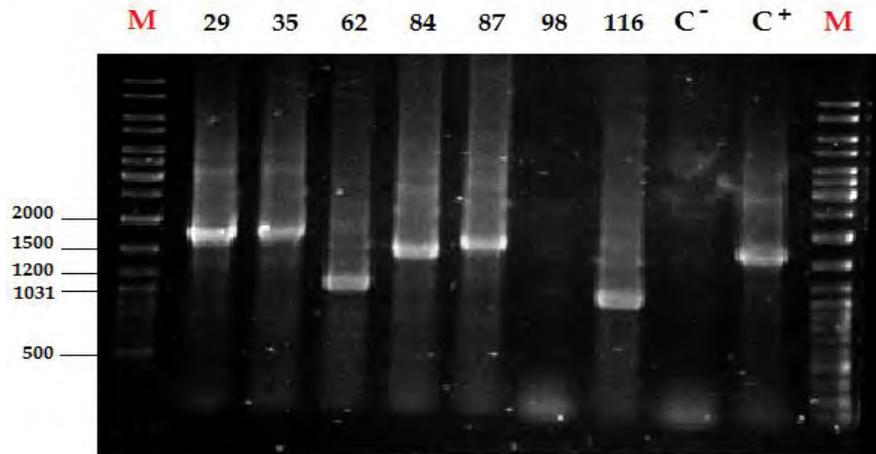


Fig. 35. Electroforesis en gel del PCR 1 para el grupo Azul y CONTROLES. Productos del PCR 1 amplificados con los oligonucleótidos SacYdiB2 y CAT100. Se aprecian bandas en los carriles 2 al 6 para ITB-29, ITB-35, ITB-62, ITB-84 e ITB-87; así como en los carriles 8 y 10, para ITB-116 y C+ (correspondiente al control positivo ITA-12), respectivamente. No se observó producto de PCR para la clona ITB-98. El carril 9 correspondiente a C- pertenece al control negativo pBSSK-ydiB. Todas las bandas se encuentran dentro del margen de las 1,709 pb o menos esperadas para este PCR. ITB-29 e ITB-35, se ubican entre las 2,000 y las 1,500 pb; ITB-84 e ITB-87, se encuentran en las 1,500 pb o ligeramente arriba de ella. ITB-62 parece ubicarse en la marca de las 1,031 pb; mientras que ITB-116, se observa un poco más abajo, entre las 1,031 y las 900 pb. Con la letra M se indican los carriles correspondientes al marcador.

PCR 2 (GRUPO ROJO)

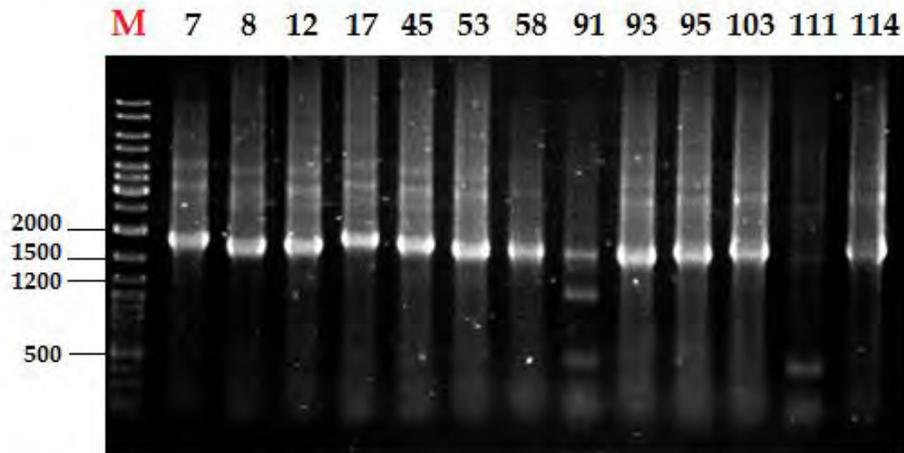


Fig. 36. Electroforesis en gel del PCR 2 para el grupo Rojo. Productos del PCR 2 amplificados con los oligonucleótidos BamHIAroE y SacYdiB2. Se observa producto de PCR en los carriles 2 al 8, correspondientes a las clonas ITB-7, ITB-8, ITB-12, ITB-17, ITB-45, ITB-53 e ITB-58; así como en los carriles 10, 11, 12 y 14 para ITB-93, ITB-95, ITB-103 e ITB-114, respectivamente. En los carriles 9 y 13, correspondientes a ITB-91 e ITB-111, no se observó producto de PCR. Todas las bandas se encuentran ubicadas en la marca de las 1,500 pb o ligeramente arriba de ésta, consistente con el producto esperado de 1,709 pb o menos, para este PCR. Con la letra M se indica el carril correspondiente al marcador.

PCR 2 (GRUPO AZUL Y CONTROLES)

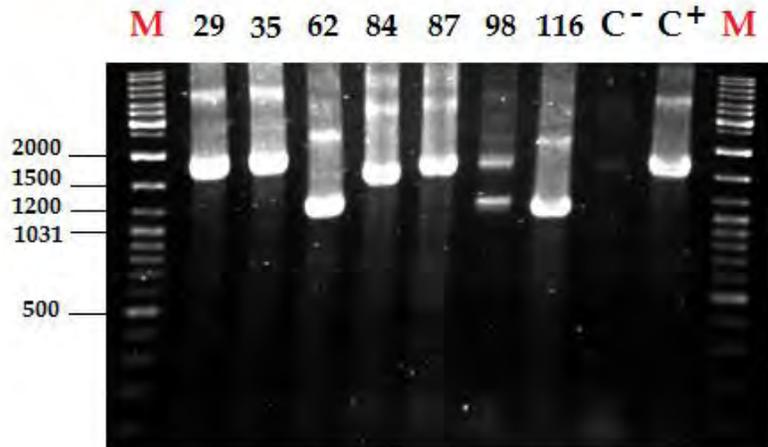


Fig. 37. Electroforesis en gel de PCR 2 para el grupo Azul y CONTROLES. Productos del PCR 2 amplificados con los oligonucleótidos SacYdiB2 y CAT100. Se observan bandas para los carriles 2 al 6, para ITB-29, ITB-35, ITB-62, ITB-84 e ITB-87, así como en los carriles 8 y 10, para ITB-116 y C+ (correspondiente al control positivo ITA-12), respectivamente. No se observó producto de PCR para la clona ITB-98. El carril 9 correspondiente a C- pertenece al control negativo pBSSK-ydiB. Todas las bandas se encuentran dentro del margen de las 1,820 pb o menos, esperadas para este PCR. ITB-29 e ITB-35, se ubican cercanas a las 2,000 pb; ITB-84 e ITB-87, se encuentran en las 2,000 y las 1,500 pb. ITB-62 parece ubicarse en la marca de las 1,200 pb; mientras que ITB-116, se observa un poco más abajo, en las 1,031 pb.

Como se puede observar en las imágenes de las electroforesis en gel para ambos PCRs, ITB-91 e ITB-111 del grupo Rojo; así como ITB-98 del grupo Azul, no muestran producto de PCR. Todas las bandas correspondientes al grupo Rojo para el PCR 1 (figura 34), se observan muy cercanas al mismo peso: ligeramente arriba de la marca correspondiente a los 1500 pb. Lo anterior concuerda con el número de pb aproximadas calculadas para ése PCR en caso de presentar fusiones casi completas de ambos genes, *aroE* y *ydiB* (1,709 pb).

Por el contrario, en la electroforesis en gel para el PCR 1 del grupo Azul (figura 35), se aprecia de forma visible una mayor variación. Así, ITB-29 e ITB-35, se encuentran al medio de las bandas de 2,000 y 1,500 pb; ITB-85, parece ubicarse en la marca de las 1500 pb, mientras que ITB-84, se aprecia ligeramente arriba de ésta. Sin embargo, todas estas quimeras del grupo Azul previamente mencionadas, también poseerían los genes *aroE* y *ydiB* prácticamente intactos o con muy poca digestión, como en el caso de las quimeras del grupo Rojo.

Por otro lado, ITB-62, parece encontrarse en la banda correspondiente a las 1,031 pb. Mejor aún, ITB-116, se observa un poco más debajo de ITB-62; entre las 1,031 y las 900 pb, aproximadamente. Por lo tanto, si consideramos un promedio respecto a lo observado en estos geles para ambas quimeras, y lo fijáramos en 1,031 pb, este dato podría sugerir una digestión en torno a las 652 pb, sólo para las secuencias de interés.

Finalmente, y en relación a los resultados del PCR 2 (figuras 36 y 37) para ambos grupos, cabe mencionar que se observan muy similares a los del PCR 1 (figuras 34 y 35, en sus colores respectivos). Esto se debe a que entre ambos, sólo hay de por medio 111 pb, ya que el valor esperado para los productos del PCR 2, ronda las 1,820 pb; mientras que para el PCR, se aproxima a las 1,709 pb. La diferencia total de pb entre los dos PCRs, corresponden a las primeras 110 pb amplificadas del inicio del gen *cat*, dada por el uso de oligonucleótido CAT100. Esta mínima diferencia es prácticamente imperceptible en los geles de electroforesis.

2ª Secuenciación de vectores ITCHY

Para conocer el estado de los híbridos, éstos se secuenciaron con los oligonucleótidos M13R y CAT100. Las secuencias fueron analizadas con ChromasLite y SeaView. Los resultados relativos las pares de bases digeridas para cada una de las quimeras, fueron los siguientes:

RELACIÓN DE PB DIGERIDAS EN GENES DE QUIMERAS ITCHY

HÍBRIDOS	<i>aroE</i> (pb digeridas)	<i>ydiB</i> (pb digeridas)	TOTAL (pb digeridas)
ITA-12	118	166	284
ITB-7	143	183	326
ITB-8	152	199	351
ITB-12	147	173	320
ITB-17	131	160	291
ITB-45	141	172	313
ITB-53	135	171	306
ITB-58	150	187	337
ITB-93	119	189	308
ITB-95	141	169	310
ITB-103	136	176	312
ITB-114	148	168	316
ITB-29	133	180	313
ITB-35	125	175	300
ITB-62	9	651	660
ITB-84	134	97	231
ITB-87	123	176	299
ITB-116	99	637	736

Tabla 6. Relación de pares de bases truncadas para *aroE* y *ydiB* en las quimeras ITCHY. En la tabla se incluye a ITA-12 del primer ITCHY, y a los 17 híbridos resultantes del segundo. En franjas largas de colores rojo, naranja y amarillo, se indican (por columnas) los valores con el mayor número de pares de bases digeridas; siendo el rojo, el más alto. En franjas cortas de colores verde, azul y morado (y en orden descendente), se muestran los valores con el menor número de pares de bases truncadas; siendo el morado, el más bajo. Así, las quimeras con el mayor y el menor número global de pb digeridas son ITB-116 e ITB-84, respectivamente.

La secuenciación de las 18 quimeras confirma la fusión exitosa de los genes *aroE* y *ydiB*. Cabe destacar que, como indicaban los productos de PCR, el Grupo Azul posee una mayor diversidad en la longitud de las secuencias fusionadas en comparación con el Grupo Rojo.

Los números resaltados en rojo y naranja, corresponden a las 2 quimeras con el mayor número de pb digeridas: **ITB-116**, en primer lugar y con un total de 736 pb; e **ITB-62**, en segundo y con 660 pb. Lo anterior resulta interesante dado que, al observar de forma individual sus secuencias truncadas, éstas coinciden con los números más altos de digestión para *ydiB* (651 pb para **ITB-62** y 637 para **ITB-116**) y los más bajos para *aroE* (9 pb para **ITB-62** y 99 pb para **ITB-116**) en ambos grupos.

En tercer lugar y en amarillo, se encuentra **ITB-8**, con tan sólo 351 pb; menos de la mitad de aquellas digeridas en **ITB-116**. Cabe mencionar, que **ITB-8** cuenta con el valor más alto de pares de bases truncadas para *aroE* (152) y con el tercero más alto para *ydiB* (199), respectivamente.

Así, tenemos que en **ITB-116**, el porcentaje de digestión para *aroE* fue del 12% mientras que para *ydiB* fue del 73.5%. En **ITB-62**, el porcentaje digerido de *aroE* se estimó en apenas el 1% contra el 75% para *ydiB*; y en **ITB-8**, estos valores se calcularon en 18.5% y 23% para *aroE* y *ydiB* respectivamente.

De manera general, y partiendo de la suma total de pares de bases de la fusión intacta de ambas secuencias (1,683 pb); el porcentaje global de digestiones para **ITB-116**, fue del 43.73%; mientras que para **ITB-62**, del 39.2% y para **ITB-8**, del 20.85%.

En cuanto a las quimeras con menor número de pb digeridas, se encuentran **ITB-17** (en color verde, con 291 pb), **ITA-12** (en azul, con 284 pb) e **ITB-84** (en morado, con 231 pb). Para **ITA-12**, su ubicación como la quimera en el penúltimo lugar global de pares de bases truncadas, resulta previsible, ya que tanto *aroE* como *ydiB*, comparten el tercer lugar correspondiente al menor número de digestiones individuales de sus secuencias. **ITB-17**, también comparte este lugar, pero a nivel global, ya que su secuencia *ydiB*, se distingue por poseer la segunda cifra con menor número de pares de bases digeridas. Finalmente, **ITB-84**, del grupo Azul y portadora de la secuencia de *ydiB* con el menor número de pb digeridas, se destaca como la quimera con la cifra más baja de pares de bases truncadas de entre todas; ubicándose a 505 pb por debajo de **ITB-116**. El porcentaje individual de truncamiento para *aroE* y *ydiB* en **ITB-84**, fue del 16.4% y el 11.1%, respectivamente; mientras que el valor global de digestión para la quimera, fue del 13.72%.

Referente a las digestiones individuales de las secuencias de *aroE* y *ydiB*, tenemos que es en ésta última, donde se observan las cifras más altas de digestión. En porcentajes, correspondería al 75% para **ITB-116**, al 73.5% para **ITB-6**, y al 23% para **ITB-8**, tan sólo para *ydiB*; contra los porcentajes (casi invariables) de las quimeras portadoras de las 3 secuencias más digeridas de *aroE*, con 18.6 % de **ITB-8**, 18.38% de **ITB-58**, y 18.13% de **ITB-114**.

Estos resultados son consistentes con lo observado previamente en los PCRs de las quimeras. La variación del grupo Azul (figuras 35 y 37) destaca sobre la del grupo Rojo, pese a que éste último casi duplica el número de clonas presentes en el primero. Así, el grupo Azul, se distingue por poseer a los híbridos **ITB-116** e **ITB-62**; con el mayor número de pares de bases digeridas totales; y a **ITB-84**, con el menor.

En cuanto a las quimeras del grupo Rojo se puede observar, que las cifras globales de pares de bases truncadas no experimentaron variaciones drásticas, ya que éstas rondaron entre las 284 pb y las 351 pb. Dicha diferencia, de apenas 67 pb de digestión entre los híbridos (contra las 505 pb del grupo Azul), se traduce en la visualización de los productos de PCR correspondiente al grupo Rojo, casi como si fueran parte de una misma banda horizontal, en relación al marcador. Esto se observa claramente en las figuras 34 y 36.

Finalmente, podemos decir que existe una variación entre las secuencias fusionadas de las quimeras por efecto de la Exonucleasa III, de entre el 13.72% y el 43.73%, de las 1,683 pb iniciales totales de ambos genes. Sin embargo, esta variación fue notablemente mayor a nivel individual para cada secuencia. El porcentaje de pares de bases digeridas en el gen *aroE*, fue de entre el 1% y el 18.6%; mientras que en *ydiB*, se estimó entre el 11.1% y el 75%.

ALINEAMIENTOS POR SEAVIEW

A continuación se presenta el resultado de la secuenciación de ITB-116, para ejemplificar el análisis realizado en todas y cada una de las 18 quimeras.

ALINEAMIENTO FORWARD CON *aroE* - CAT

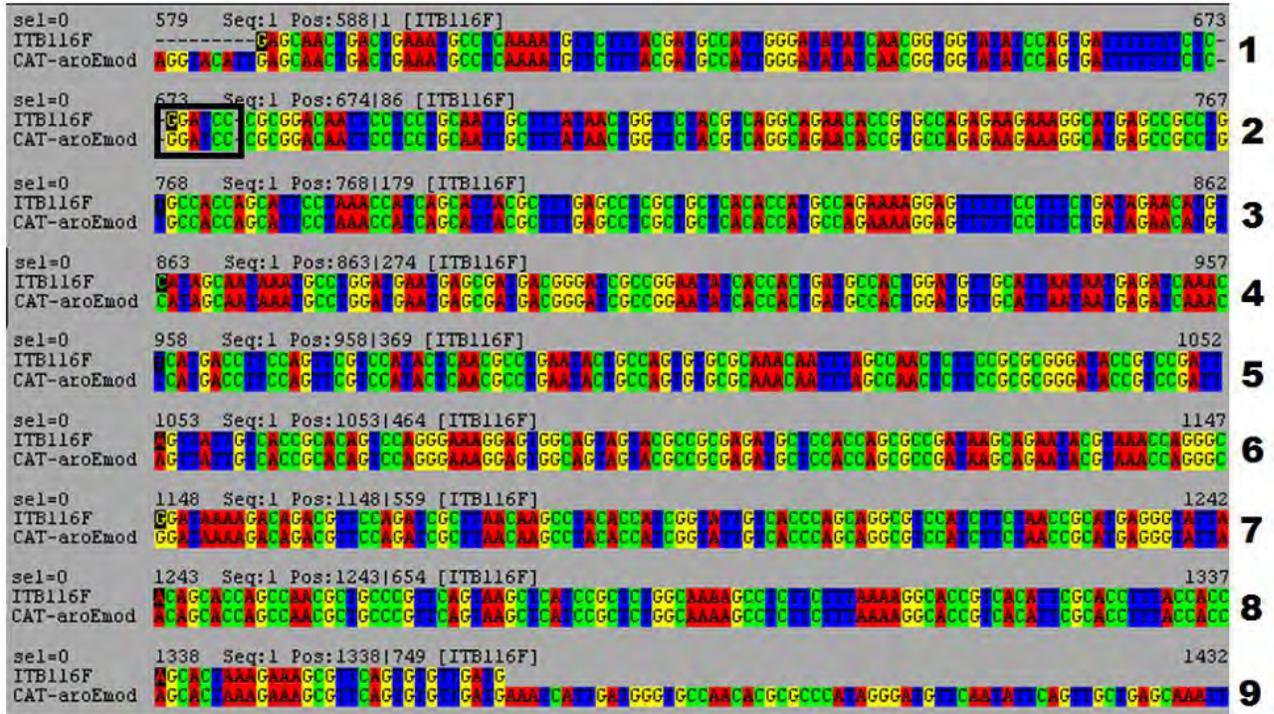


Fig. 38. Alineamiento de la secuencia Forward de ITB-116 con la secuencia modelo de *aroE*-CAT. En el bloque 1 se observan las primeras 100 pb de *cat*, y en el siguiente, dentro de un cuadrado negro, se indica el sitio de restricción BamHI, seguido de la secuencia de *aroE* en su extremo final.

ALINEAMIENTO REVERSE CON pBSSK⁻ydiB

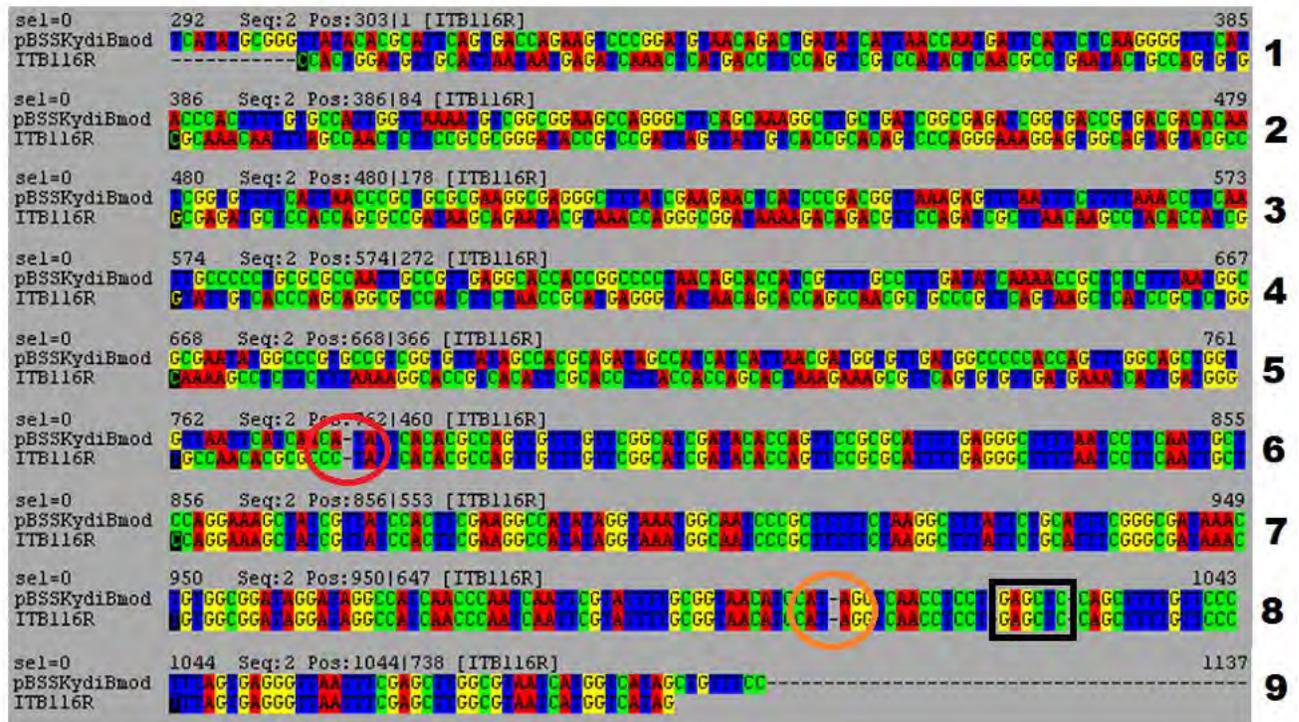


Fig. 39. Alineamiento de la secuencia Reverse de ITB-116 con la secuencia modelo de pBSSK⁻ydiB. En los 5 primeros bloques y parte del sexto, se observa una sección no concordante de la secuencia de la quimera (correspondiente a *aroE*), con la secuencia de *ydiB* de la secuencia modelo. En el sexto bloque, dentro de un círculo rojo y separado por guiones, se observa el alineamiento de la segunda sección de la secuencia de ITB116R con *ydiB*. En el bloque 8 se indica en un círculo naranja y con un guion, el inicio de *ydiB* (cuyo codón de inicio se localiza del lado izquierdo) y en un cuadrado negro, el sitio de restricción *SacI*, respectivamente.

ALINEAMIENTO REVERSE CON *aroE* - CAT

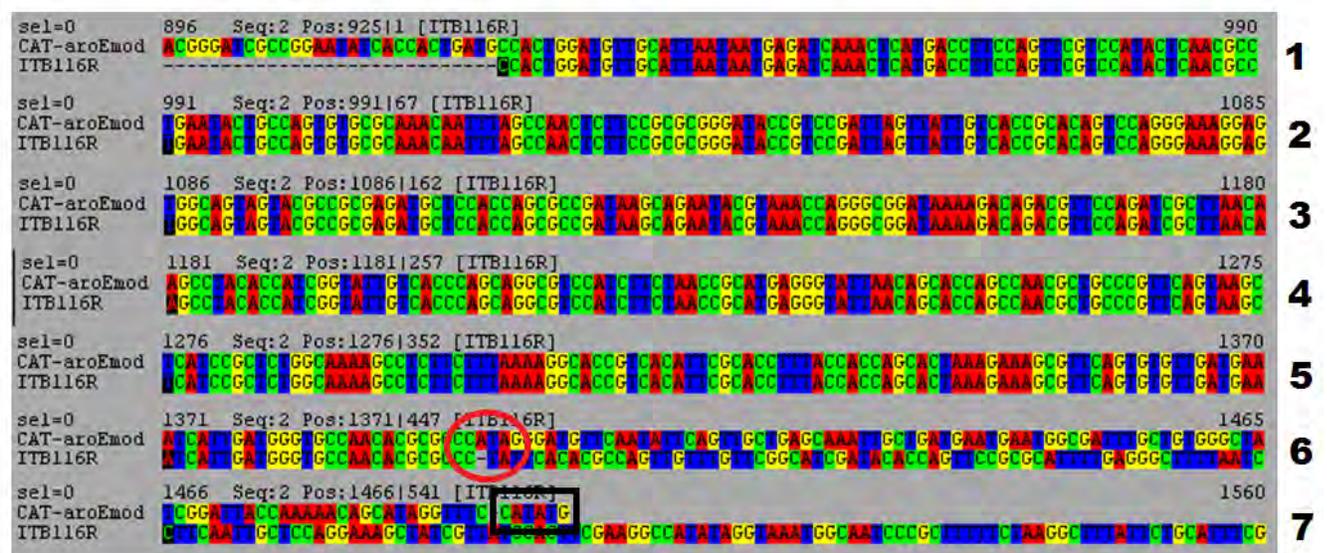


Fig. 40. Alineamiento (de la sección “no alineada” de la Fig. 39) de la secuencia Reverse de ITB-116 con la secuencia modelo de *aroE*-CAT. En los 5 primeros bloques y parte del sexto, se observa el alineamiento de la secuencia quimera con *aroE*. En el sexto bloque dentro de un círculo rojo, e indicado con 1 guion en la secuencia de ITB116R, se muestra el inicio de la sección (ahora) no alineada con la secuencia modelo, consistente con la fusión a *ydiB*. En el bloque 7 de la secuencia modelo y dentro de un cuadrado negro, se observan las últimas 6 pb, correspondientes al sitio de restricción *NdeI*, indicativas del inicio de *aroE*. En este alineamiento, no se alcanza a observar la secuencia de *cat*.

Como se observa, los alineamientos de las secuencias de *ydiB* y *aroE* con la quimera ITB-116 indican las secciones de cada gen que lograron recombinarse exitosamente mediante el método ITCHY.

A continuación, se representa de manera específica y sobre la secuencia de cada gen, las bases correspondientes a *aroE* y *ydiB* que lograron fusionarse entre sí para formar la quimera ITB-116.

SECUENCIA DE *aroE* EN QUIMERA ITB-116

```

1  ATGGAAACCT  ATGCTGTTTT  TGGTAATCCG  ATAGCCCACA  GCAAATCGCC
51  ATTCATTCAT  CAGCAATTTG  CTCAGCAACT  GAATATTGAA  CATCCCTATG
101  GCGCGTGTT  GGCACCCATC  AATGATTTCA  TCAACACACT  GAACGCTTTC
151  TTTAGTGCTG  GTGGTAAAGG  TGCGAATGTG  ACGGTGCCTT  TTAAAGAAGA
201  GGCTTTTGCC  AGAGCGGATG  AGCTTACTGA  ACGGGCAGCG  TTGGCTGGTG
251  CTGTTAATAC  CCTCATGCGG  TTAGAAGATG  GACGCCTGCT  GGGTGACAAT
301  ACCGATGGTG  TAGGCTTGTT  AAGCGATCTG  GAACGTCTGT  CTTTTATCCG
351  CCCTGGTTTA  CGTATTCTGC  TTATCGGCGC  TGGTGGAGCA  TCTCGCGGCG
401  TACTACTGCC  ACTCCTTTCC  CTGGACTGTG  CGGTGACAAT  AACTAATCGG
451  ACGGTATCCC  GCGCGGAAGA  GTTGGCTAAA  TTGTTTGCGC  AACTGCGCAG
501  TATTCAGGCG  TTGAGTATGG  ACGAACTGGA  AGGTCATGAG  TTTGATCTCA
551  TTATTAATGC  AACATCCAGT  GGCATCAGTG  GTGATATTCC  GCGCATCCCG
601  TCATCGCTCA  TTCATCCAGG  CATTATTATG  TATGACATGT  TCTATCAGAA
651  AGGAAAAACT  CCTTTTCTGG  CATGGTGTGA  GCAGCGAGGC  TCAAAGCGTA
701  ATGCTGATGG  TTTAGGAATG  CTGGTGGCAC  AGGCGGCTCA  TGCCTTTCTT
751  CTCTGGCAGG  GTGTTCTGCC  TGACGTAGAA  CCAGTTATAA  AGCAATTGCA
801  GGAGGAATTG  TCCGCG

```

Fig. 41. En rojo se observa la secuencia de *aroE* presente en la quimera ITB-116, correspondiente a 717 pb; en negro, la sección truncada de *aroE* y en morado, la zona de fusión con *ydiB*.

SECUENCIA DE *ydiB* EN QUIMERA ITB-116

```

1  ATGGATGTTA  CCGCAAATA  CGAATTGATT  GGGTTGATGG  CCTATCCTAT
51  CCGCCACAGT  TTATCGCCCG  AAATGCAGAA  TAAAGCCTTA  GAAAAAGCGG
101  GATTGCCATT  TACCTATATG  GCCTTCGAAG  TGGATAACGA  TAGCTTTCCCT
151  GGAGCAATTG  AAGGATTAAA  AGCCCTCAA  ATGCGCGGAA  CTGGTGTATC
201  GATGCCGAAC  AAACAACCTGG  CGTGTGAATA  TGTTGATGAA  TTAACACCAG
251  CTGCCAAACT  GGTGGGGGCC  ATCAACACCA  TCGTTAATGA  TGATGGCTAT
301  CTGCGTGGCT  ATAACACCGA  CGGCACGGGC  CATATTCGCG  CCATTAAAGA
351  GAGCGGTTTT  GATATCAAAG  GCAAACGAT  GGTGCTGTTA  GGGGCCGGTG
401  GTGCCTCAAC  GGCAATTGGC  GCGCAGGGGG  CAATTGAAGG  TTTAAAAGAA
451  ATTAAACTCT  TTAACCGTCG  GGATGAGTTC  TTCGATAAAG  CCCTCGCCTT
501  CGCGCAGCGG  GTTAATGAAA  ACACCGATTG  TGTCGTCACG  GTCACCGATC
551  TCGCCGATCA  GCAAGCCTTT  GCTGAAGCCC  TGGCTTCCGC  CGACATTTTA
601  ACCAATGGCA  CAAAAGTGGG  TATGAAACCC  CTTGAGAATG  AATCATTGGT
651  TAATGATATC  AGTCTGTTAC  ATCCGGGACT  TCTGGTCACT  GAATGCGTGT
701  ATAACCGCA  TATGACGAAG  TTATTGCAGC  AGGCGCAACA  AGCTGGTTGC
751  AAAACGATTG  ATGGATACGG  CATGTTGTTG  TGGCAAGGGG  CTGAACAGTT
801  CACATTATGG  ACTGGCAAAG  ATTTCCCTCT  GGAATATGTT  AAACAGGTCA
851  TGGGGTTCGG  TGCCTGA

```

Fig. 42. En verde, se observa la secuencia de *ydiB* presente en la quimera ITB-116, correspondiente a 230 pb; en negro, la sección truncada de *ydiB*. En amarillo, la zona de fusión entre *ydiB* y *aroE*.

A continuación se presenta el mapa circular de lo que sería un vector híbrido ITCHY a nivel general, así como el de la quimera ITB-116. Ésta última, fue seleccionada de entre todas aquellas obtenidas, por ser la que mejor representa el resultado del protocolo ITCHY realizado y por ostentar el mayor número total de bases truncadas entre ambos genes.

MAPA CIRCULAR DE VECTOR ITCHY

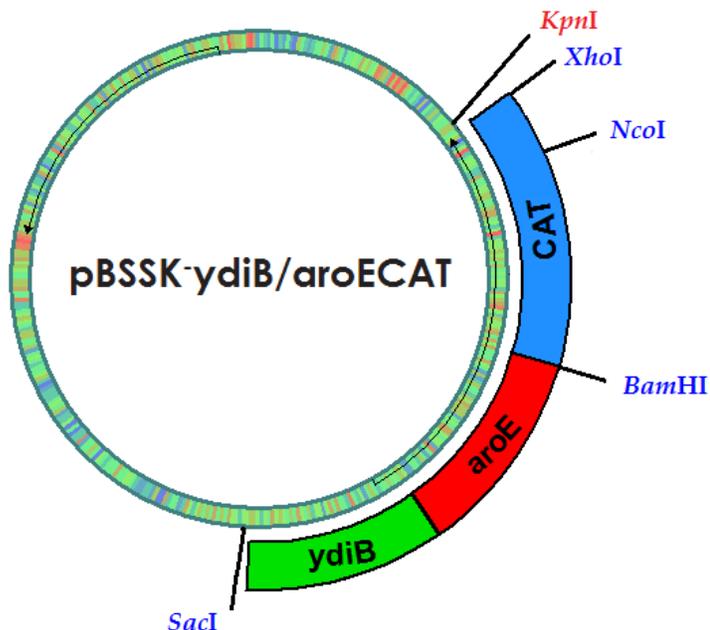


Figura 43. Plásmido pBSSK-ydiB/aroECAT. Representación general de las quimeras ITCHY, con las secuencias *aroE* y *ydiB* fusionadas y las ubicaciones finales de los sitios de restricción utilizados durante el proyecto.

MAPA CIRCULAR DE ITB-116

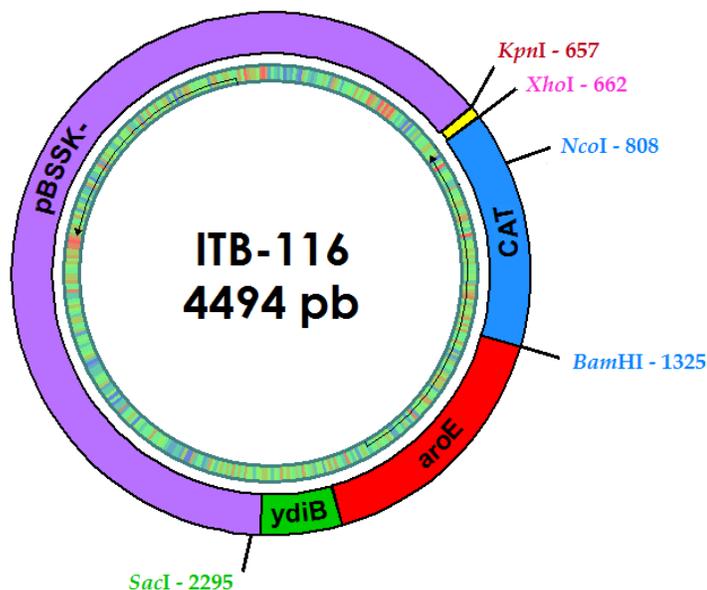


Figura 44. Plásmido quimera ITB-116 representado con los sitios e insertos en color correspondientes al diseño lineal elaborado inicialmente en la sección de proyecciones del ITCHY, Materiales y Métodos (figura 17, pág. 31).

MIC DE QUIMERAS ITCHY

Las 17 quimeras ITB, ITA-12 y pBSSK γ diB y pT4-CAT (estos dos últimos como controles), fueron transformados en células XLIBLue. De las construcciones ITCHY, se plaquearon 1 μ l y 5 μ l en cajas con Ampicilina, mientras que 1 μ l de cada uno de los controles fueron plaqueados en 1 caja de Ampicilina y otra de Kanamicina, respectivamente. Las cajas se incubaron a 30 °C, y una vez crecidas las colonias, se picó una colonia por caja para inocularlas en 1ml de LB + (Amp o Km), a 37°C. A partir de la hora se comenzó a monitorear las OD's.

Cabe mencionar, que las células transformadas con los controles, crecerán de forma distinta en cada MIC o caja de crecimiento, ya que su calidad de positivos o negativos variará en función del antibiótico donde se cultiven. Así, mientras ambos crecerán en LB, pBSSK γ diB sólo crecerá en Ampicilina, pT4-CAT sólo lo hará en Cloranfenicol, y ninguno de los dos en ambos antibióticos.

Diluciones: Una vez que los cultivos alcanzaron entre las 2 y 2.5 OD's, fueron diluidos cada uno a 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} .

Preparación de cajas: A partir del cálculo de las concentraciones de los antibióticos existentes en el laboratorio, se prepararon las cajas para el crecimiento de los cultivos diluidos. Debido a que no era posible plaquear todas las clonas en una sola caja, se dividieron en 2 partes retomando el grupo Rojo y el grupo Azul. Para equilibrar el número de quimeras por caja, ITB-103 e ITB-104 del grupo Rojo e ITA-12, fueron incluidas en el grupo Azul.

- **GRUPO ROJO:** ITB-7, ITB-8, ITB-12, ITB-17, ITB-45, ITB-53, ITB-58, ITB-93, ITB-95.
- **GRUPO AZUL:** ITB-103, ITB-114, ITB-29, ITB-35, ITB-62, ITB-84, ITB-87, ITB-116, ITA-12.

MIC DE ITCHY: ANTIBIÓTICOS Y SUS CONCENTRACIONES

	CAJAS No.	MEDIOS	Concentración de Amp	Concentración de Cm
GRUPO ROJO	1	LB R	0 μ g	0 μ g
	2	Amp R	200 μ g	0 μ g
	3	Cm 5 R	0 μ g	5 μ g
	4	Cm 10 R	0 μ g	10 μ g
	5	Cm 20 R	0 μ g	20 μ g
	6	Cm 40 R	0 μ g	40 μ g
	7	Amp + Cm R	200 μ g	5 μ g
	8	Amp + Cm R	200 μ g	10 μ g
	9	Amp + Cm R	200 μ g	20 μ g
	10	Amp + Cm R	200 μ g	40 μ g
GRUPO AZUL	11	LB A	0 μ g	0 μ g
	12	Amp A	200 μ g	0 μ g
	13	Cm 5 A	0 μ g	5 μ g
	14	Cm 10 A	0 μ g	10 μ g
	15	Cm 20 A	0 μ g	20 μ g
	16	Cm 40 A	0 μ g	40 μ g
	17	Amp + Cm A	200 μ g	5 μ g
	18	Amp + Cm A	200 μ g	10 μ g
	19	Amp + Cm A	200 μ g	20 μ g
	20	Amp + Cm A	200 μ g	40 μ g

Tabla.7. Se muestran el número de cajas, los antibióticos utilizados y la concentración de los mismos en el plaqueado de las clonas ITCHY, divididas en grupos rojo y azul.

Así, en base a la tabla anterior, se prepararon las cajas de crecimiento en LB y Ampicilina, así como las respectivas para los MICs. El procedimiento se llevó a cabo de igual manera que para aquellos elaborados para las construcciones iniciales. Con ayuda de una pipeta multicanal y una placa ELISA, se colocaron gotas de 3µl con las respectivas diluciones en las cajas con medio, se sellaron con parafilm y se incubaron a 30°C hasta que se observaron colonias de buen tamaño. Los resultados fueron los siguientes:

CRECIMIENTO DE QUIMERAS EN LB

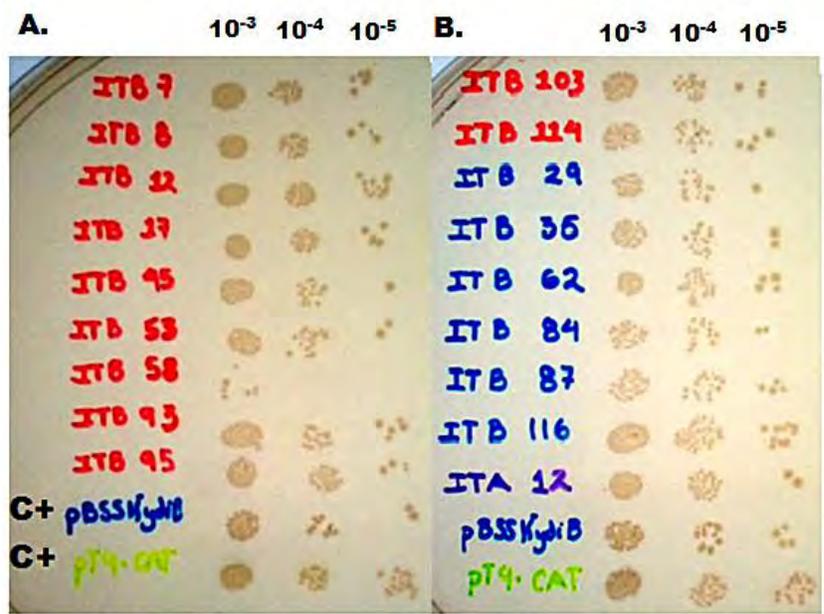


Fig.45. Crecimiento de quimeras en LB. A. Grupo Rojo. B. Grupo Azul. Se observó desarrollo de colonias con las construcciones ITCHY y los controles en todas las diluciones, excepto para ITB-58.

CRECIMIENTO DE QUIMERAS EN AMP

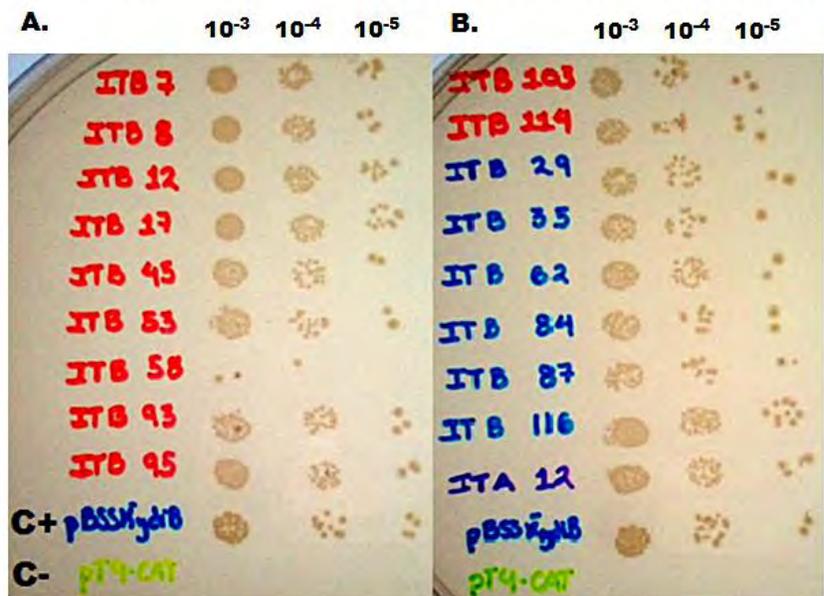


Fig.46. Crecimiento de quimeras en Amp [200µg/ml]. A. Grupo Rojo. B. Grupo Azul. Se observó desarrollo de colonias con las construcciones ITCHY y el control positivo en todas las diluciones, excepto para ITB-58 y el control negativo.

En la caja con medio LB (figura 45), se puede observar un crecimiento uniforme en todas las diluciones de las quimeras de ambos grupos y sus controles, excepto para la clona **ITB-58**, que sólo presenta 6 colonias en aquella de mayor densidad. Considerando que en estas condiciones no existe presión selectiva por antibiótico, y que previamente se logró cultivar esta misma clona en LB líquido con Ampicilina, es muy posible que haya existido un error en la preparación de la dilución o en el plaqueo de las gotas correspondientes a esta quimera.

Por otro lado, en la caja con Ampicilina (figura 46), también se puede apreciar un crecimiento homogéneo para la mayoría de las quimeras, a excepción del control negativo pT4-CAT (como lo esperado). Sin embargo, para este antibiótico, también se observa el fenómeno ocurrido para **ITB-58** en LB: no hubo crecimiento significativo. A la dilución 10^{-3} , apenas se formaron 2 colonias; a la 10^{-4} , sólo 1, y a la 10^{-5} , ninguna. En base a lo producido en ambas cajas, resulta más probable que la irregularidad observada en el crecimiento de dichas células transformadas, se deba a una mala dilución del cultivo perteneciente a esta quimera en particular.

MIC QUIMERAS EN CM (GRUPO ROJO)

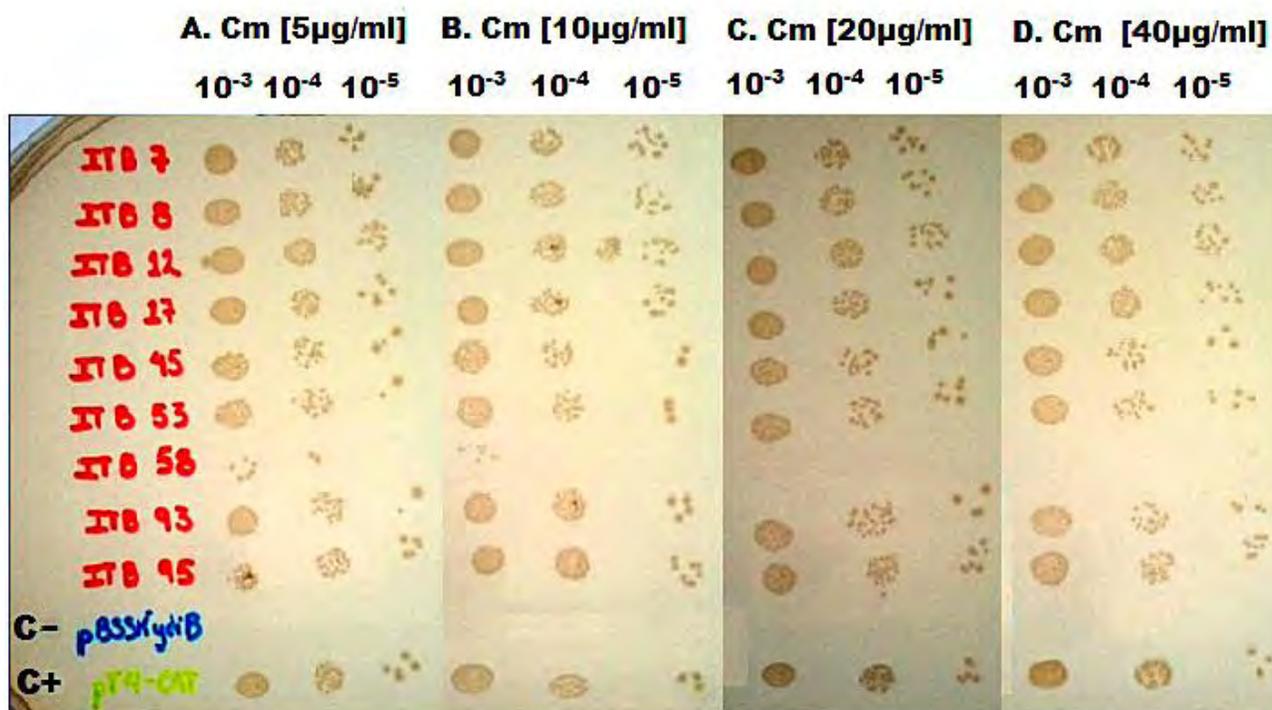


Fig.47. MIC de quimeras del grupo Rojo a diferentes concentraciones de Cm. A. Cm [5µg/ml]. B. Cm [10 µg/ml]. C. Cm [20µg/ml]. D. Cm [40µg/ml]. La mayoría de las quimeras, excluyendo a ITB-58, presentaron un crecimiento uniforme. El control negativo, con pBSSK⁻ydiB no creció, como lo esperado para este antibiótico.

En este MIC, se puede apreciar claramente, crecimiento en todas las diluciones de cada una de las clonas y del control positivo pT4-CAT; a excepción de **ITB-58**. Por lo tanto, el MIC para **ITB-7**, **ITB-8**, **ITB-12**, **ITB-17**, **ITB-45**, **ITB-53**, **ITB-93** e **ITB-95**, corresponde a Cm [**>40 µg/ml**] tanto para diluciones de alta como de baja densidad.

Respecto a la quimera **ITB-58**, continúan las inconsistencias, ya que a $5\mu\text{g/ml}$ de Cm se observa el crecimiento de 6 y 2 colonias para las diluciones 10^{-3} y 10^{-4} , respectivamente; siendo que a $10\mu\text{g/ml}$ de Cm, se observan 6 colonias de menor tamaño para la dilución de alta densidad y ninguna colonia para la dilución 10^{-4} . Aunque se podría hacer un cálculo tentativo del MIC de Cm para este híbrido, el casi nulo crecimiento en LB (figura 45.A), es un fuerte indicativo de un error en el manejo del cultivo de esta clona y como tal, no permite determinar con certeza dicho valor ni el arrojado en otros MICs que contengan la misma muestra.

MIC QUIMERAS EN CM (GRUPO AZUL)

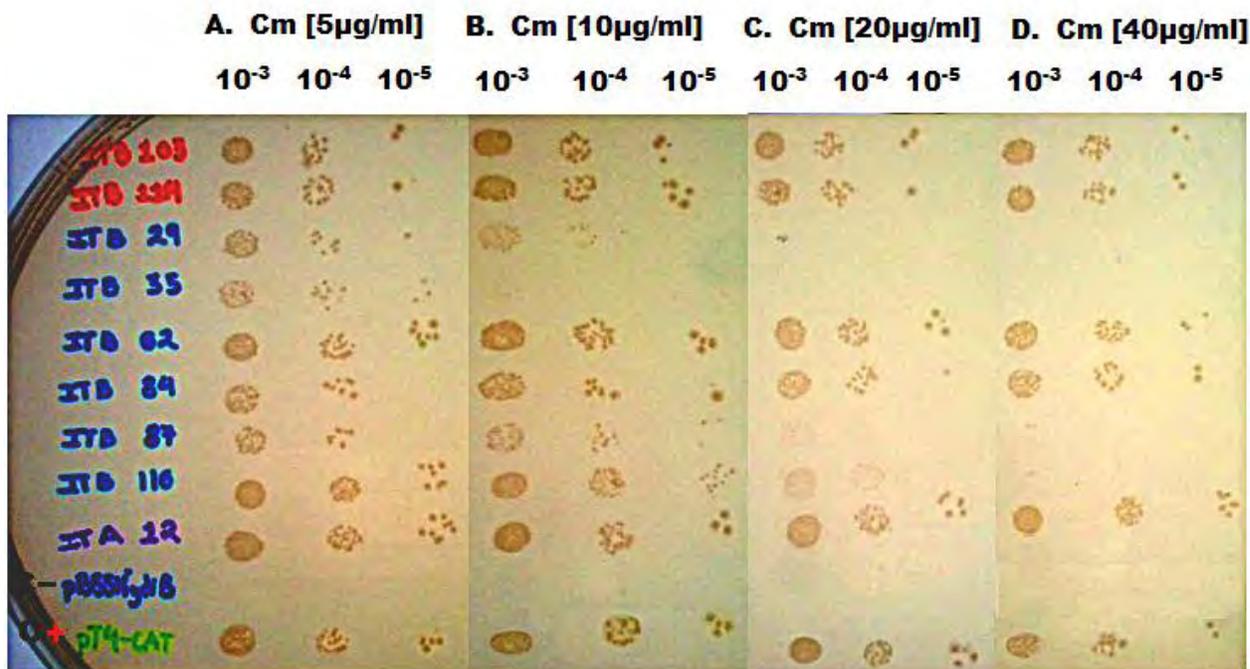


Fig. 48. MIC de quimeras del grupo Azul a diferentes concentraciones de Cm. A. Cm [$5\mu\text{g/ml}$]. B. Cm [$10\mu\text{g/ml}$]. C. Cm [$20\mu\text{g/ml}$]. D. Cm [$40\mu\text{g/ml}$]. Se observa una mayor variabilidad en los patrones de crecimiento de las colonias para las diferentes quimeras. El control pBSSK⁺ydiB no creció, como lo esperado para este antibiótico.

Los MICs para Cm de las células que expresan las proteínas híbridas pertenecientes al grupo Azul, fueron variables. **ITB-103**, **ITB-114**, **ITB-62**, e **ITA-12** presentaron un MIC de Cm [$>40\mu\text{g/ml}$] para las diluciones de alta y baja densidad.

Por debajo de estos datos, y en orden descendente, se encontró **ITB-116**, con un MIC de Cm [$40\mu\text{g/ml}$] para la dilución de alta densidad y de Cm [$20\mu\text{g/ml}$], para la de baja.

Con valores ligeramente por debajo de los previamente mencionados, se posicionó la quimera **ITB-29**, con la misma cifra que **ITB-116** para la dilución 10^{-3} , pero con Cm [$10\mu\text{g/ml}$] para la de 10^{-5} .

Por su parte, **ITB-35**, obtuvo los MICs más bajos para ambas diluciones, con tan sólo Cm [$10\mu\text{g/ml}$].

Finalmente, se mencionan aquellas quimeras cuyos MICs para diluciones 10^{-5} , no pudieron ser determinados debido a irregularidades en los patrones de crecimiento: **ITB-84** e **ITB-87**. El valor para el MIC de alta dilución en **ITB-84** se calculó en **Cm [$>40 \mu\text{g/ml}$]**, mientras que para **ITB-87**, éste fue de **Cm [$40 \mu\text{g/ml}$]**.

En relación a los controles, sólo creció pT4-CAT.

MIC QUIMERAS EN AMP Y CM (GRUPO ROJO)

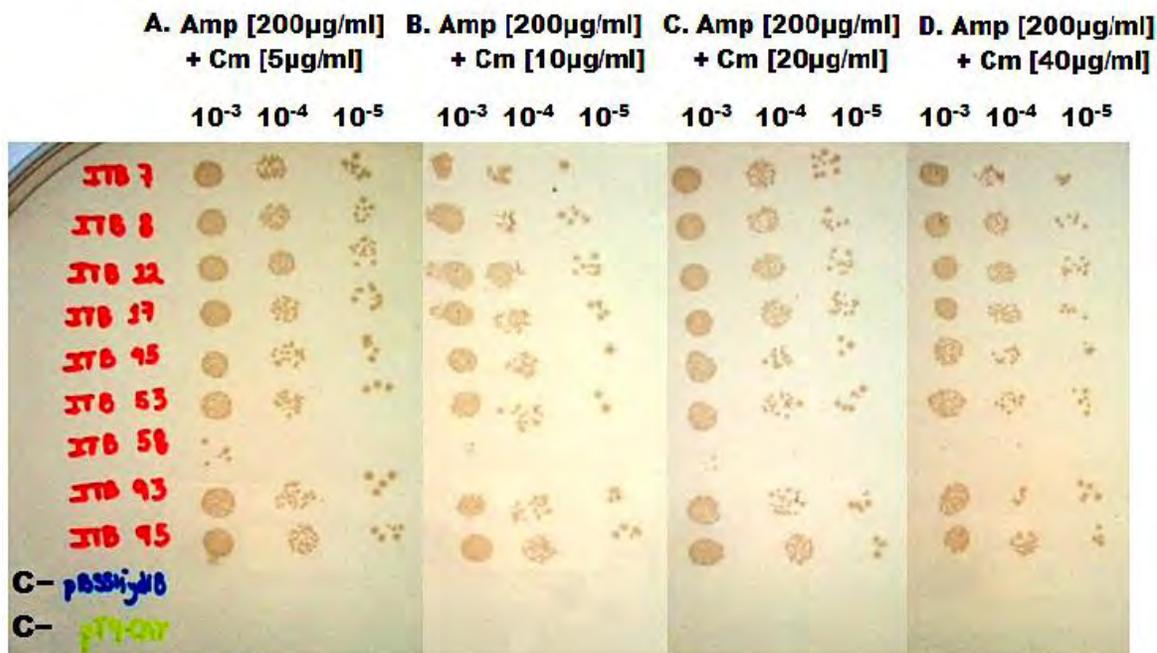


Fig. 49. MIC de quimeras del Grupo Rojo. **A.** Amp [$200 \mu\text{g/ml}$] + Cm [$5 \mu\text{g/ml}$]. **B.** Amp [$200 \mu\text{g/ml}$] + [Cm $10 \mu\text{g/ml}$]. **C.** Amp [$200 \mu\text{g/ml}$] + Cm [$20 \mu\text{g/ml}$]. **D.** Amp [$200 \mu\text{g/ml}$] + Cm [$40 \mu\text{g/ml}$]. La mayoría de las quimeras, a excepción de **ITB-58**, presentaron un crecimiento homogéneo. Ninguno de los controles creció, de acuerdo a lo esperado.

En relación a este MIC, correspondiente al grupo Rojo y elaborado con ambos antibióticos, se encontró que los patrones de crecimiento fueron muy similares a aquellos observados en el MIC de sólo Cloranfenicol del mismo grupo (figura 47, pág. 68). Todas las quimeras, a excepción de **ITB-58**, mostraron crecimiento de colonias en todas las concentraciones de antibiótico y en las 3 diferentes diluciones; por lo que su MIC se calculó en **Amp [$200 \mu\text{g/ml}$] + Cm [$>40 \mu\text{g/ml}$]** para las diluciones de alta y baja densidad.

En el caso de **ITB-58**, y por los motivos previamente mencionados, tampoco fue posible determinar las cifras correspondientes a este MIC para ninguna de sus diluciones.

Respecto a los controles, cabe mencionar que ninguna de las cepas transformadas con los plásmidos pBSSK⁻ydiB y pT4-CAT creció, ya que sólo poseían resistencia para uno de los dos antibióticos.

MIC QUIMERAS EN AMP Y CM (GRUPO AZUL)

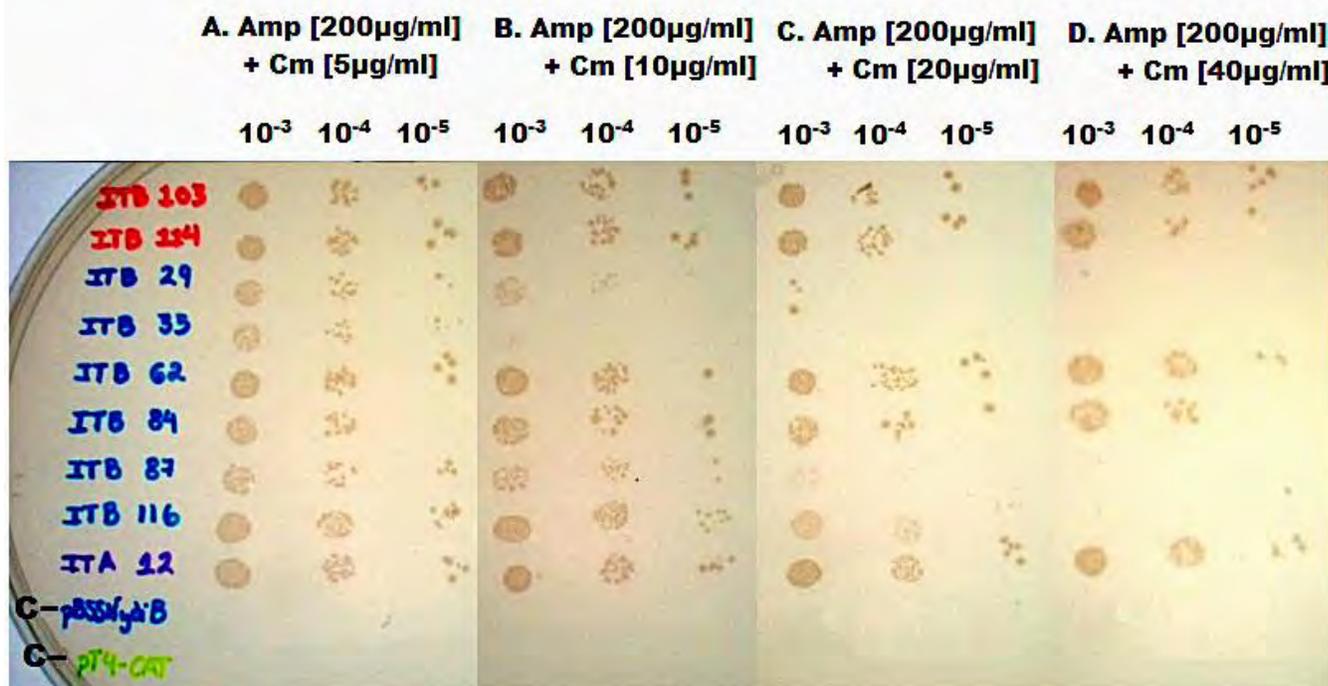


Fig.50. MIC de quimeras del Grupo Azul. **A.** Amp [200µg/ml] + Cm [5µg/ml]. **B.** Amp [200µg/ml] + Cm [10µg/ml]. **C.** Amp [200µg/ml] + Cm [20µg/ml]. **D.** Amp [200µg/ml] + Cm [40µg/ml]. A diferencia de lo observado en el Grupo Rojo, para este MIC, se aprecia una mayor diversidad en los patrones de crecimiento de las colonias para las diferentes quimeras. Los controles con los plásmido pT4-CAT y pBSSK⁻ydiB no crecieron, conforme a lo esperado.

Así como lo reportado en el MIC anterior, éste, correspondiente al de ambos antibióticos para el grupo Azul, también muestra patrones de crecimiento similares a los hallados en el MIC de sólo Cloranfenicol para el grupo respectivo (figura 48, pág. 69). Las quimeras **ITB-103**, **ITB-114**, **ITB-62**, e **ITA-12** presentaron un MIC de Amp [200 µg/ml] + Cm [>40 µg/ml] para las diluciones de alta y baja densidad.

A estos valores, les siguió **ITB-116** e **ITB-87**, ambos con un MIC de Amp [200 µg/ml] + Cm [40 µg/ml] para la dilución de alta densidad y de Amp [200 µg/ml] + Cm [20 µg/ml], para la de baja.

Muy cercana a estas quimeras se ubicó **ITB-29**, compartiendo el mismo valor para el MIC de alta densidad encontrado para **ITB-116** e **ITB-87**, pero presentando una variación de 10 µg respecto a la de baja densidad; con un MIC de Amp [200 µg/ml] + Cm [10 µg/ml], para la dilución 10⁻⁵.

ITB-35, así como en el MIC de sólo Cloranfenicol, también obtuvo las cifras de MICs más bajas para ambas diluciones, exhibiendo el mismo valor para dicho antibiótico: Amp [200 µg/ml] + Cm [10 µg/ml].

Por último, está la quimera **ITB-84**, cuya dilución 10⁻⁵ no pudo ser especificada debido a inconsistencias en los patrones de crecimiento a razón de un posible error inicial en la resuspensión o

el plaqueo de la gota. Sin embargo, el valor para el MIC de alta dilución sí logró ser fijado en Amp [200 µg/ml] + Cm [>40 µg/ml].

Los controles correspondientes a las bacterias transformadas con los plásmidos pBSSK⁻ydiB y pT4-CAT no crecieron (como lo planeado), por las razones ya expuestas en el MIC anterior.

MICs Y CRECIMIENTOS DE QUIMERAS ITCHY

MIC/Crec. Quimeras	Crecimiento en:				MIC Cm (µg/ml)		MIC Amp (µg/ml) + Cm (µg/ml)	
	LB		Amp[200 µg/ml]		Alta δ	Baja δ	Alta δ	Baja δ
	Alta δ	Baja δ	Alta δ	Baja δ	Alta δ	Baja δ	Alta δ	Baja δ
ITA-12	✓	✓	✓	✓	>40	>40	Amp 200 + Cm >40	Amp 200 + Cm >40
ITB-7	✓	✓	✓	✓	>40	>40	Amp 200 + Cm >40	Amp 200 + Cm >40
ITB-8	✓	✓	✓	✓	>40	>40	Amp 200 + Cm >40	Amp 200 + Cm >40
ITB-12	✓	✓	✓	✓	>40	>40	Amp 200 + Cm >40	Amp 200 + Cm >40
ITB-17	✓	✓	✓	✓	>40	>40	Amp 200 + Cm >40	Amp 200 + Cm >40
ITB-45	✓	✓	✓	✓	>40	>40	Amp 200 + Cm >40	Amp 200 + Cm >40
ITB-53	✓	✓	✓	✓	>40	>40	Amp 200 + Cm >40	Amp 200 + Cm >40
ITB-58	±	✗	±	✗	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
ITB-93	✓	✓	✓	✓	>40	>40	Amp 200 + Cm >40	Amp 200 + Cm >40
ITB-95	✓	✓	✓	✓	>40	>40	Amp 200 + Cm >40	Amp 200 + Cm >40
ITB-103	✓	✓	✓	✓	>40	>40	Amp 200 + Cm >40	Amp 200 + Cm >40
ITB-114	✓	✓	✓	✓	>40	>40	Amp 200 + Cm >40	Amp 200 + Cm >40
ITB-29	✓	✓	✓	✓	40	10	Amp 200 + Cm 40	Amp 200 + Cm 10
ITB-35	✓	✓	✓	✓	10	10	Amp 200 + Cm 10	Amp 200 + Cm 10
ITB-62	✓	✓	✓	✓	>40	>40	Amp 200 + Cm >40	Amp 200 + Cm >40
ITB-84	✓	✓	✓	✓	>40	N.D.	Amp 200 + Cm >40	N.D.
ITB-87	✓	✓	✓	✓	40	N.D.	Amp 200 + Cm 40	Amp 200 + Cm 20
ITB-116	✓	✓	✓	✓	40	20	Amp 200 + Cm 40	Amp 200 + Cm 20

Tabla 8. Relación de crecimiento de las quimeras en LB y Amp, así como de sus MICs, calculados en diluciones de alta y baja concentración. En colores, se destacan los valores diferentes a Cm [>40µg/ml], para el MIC de sólo Cloranfenicol, y a Amp [200 µg/ml] + Cm [>40µg/ml], para el MIC con ambos antibióticos. En verde, se indican los valores para ITB-29 e ITB-116. En azul, se indica el correspondiente para ITB-35. En morado y rosa, los propios para ITB-87 e ITB-84 (respectivamente), que sí pudieron ser determinados. En rojo, se resaltan aquellos que no fue posible calcular (N.D.=“No Determinado”). Con el símbolo ✓, se señala crecimiento de colonias; con ±, crecimiento menor al esperado, y con ✗, ausencia de colonias, respectivamente.

De manera general, se puede observar que, en todas aquellas quimeras cuyos valores para ambos MICs pudieron ser fijados, las cifras calculadas correspondientes al Cloranfenicol, fueron exactamente las mismas para el MIC con ambos antibióticos que para el MIC con sólo 1. Lo anterior se aplica para cada caso individual pero persiste para todos los híbridos; lo cual es un resultado diferente al esperado (tabla 8).

Considerando el efecto conjunto de ambos antibióticos sobre las células transformadas, sería razonable esperar una disminución general del crecimiento de colonias frente a ésta doble presión

por antibiótico correspondiente al MIC de Amp+Cm. Sin embargo, este resultado, aunado al hallazgo de que más de la mitad de las quimeras (**ITA-12, ITB-7, ITB-8, ITB-12, ITB-17, ITB-45, ITB-53, ITB-93, ITB-95, ITB-103, ITB-114 e ITB-62**), poseen un MIC de **Amp [200 µg/ml] + Cm [>40 µg/ml]** para las diluciones de alta y baja concentración, podría sugerir que se manejaron concentraciones muy bajas de Cloranfenicol, y a la vez, hablaría de la necesidad de probar con concentraciones mayores y menos espaciadas entre sí.

Esta interpretación se podría estar reflejando, en el cálculo ocurrido entre las quimeras **ITB-116** (tabla 8, en verde) e **ITB-87** (en morado) para la concentración **Amp [200µg/ml] + Cm [20µg/ml]**. En la figura 50.C, se logra apreciar una diferencia evidente entre la densidad de sus colonias de tipo más bien cualitativo, y sin embargo; al no observarse crecimiento para ninguna de ellas en la concentración siguiente (figura 50.D), ambas fueron estrictamente determinadas bajo lo observado y por tanto, con el mismo MIC.

En este caso, resulta probable que el MIC real para **ITB-87**, se ubique entre **[200µg/ml] + Cm [\leq 25µg/ml]** y **[200µg/ml] + Cm [\approx 30µg/ml]**; mientras que para **ITB-116**, se calcule entre **Amp [200µg/ml] + Cm [\approx 35µg/ml]** y **[200µg/ml] + Cm [\leq 40µg/ml]**, como un aproximado.

Algo similar, pero a concentraciones mayores de antibiótico, pudo haber ocurrido con ambos grupos de quimeras, siendo que el 66% de éstas (91.6% tan sólo para el grupo Rojo), compartieron el máximo valor de MIC para ambas diluciones. Este uso del antibiótico pudo haber sesgado de cierta forma el resultado de este experimento, al sólo permitirnos observar una parte del escenario completo.

Así, respecto a lo visto para este experimento, el grupo Azul, presentó una variabilidad mayor en los MICs, no sólo en comparación con el grupo Rojo sino también dentro de su mismo grupo. Por esta razón, se puede encontrar a **ITB-62**, que cuenta con el valor más alto posible de MIC, correspondiente a **Amp [200 µg/ml] + Cm [>40 µg/ml]** para ambas diluciones, pero también a **ITB-35** (en azul), con la cifra más baja de todas, referida en **Amp [200 µg/ml] + Cm [10 µg/ml]**, también para las diluciones 10^{-3} y 10^{-5} . Estas quimeras, son claros representantes de dicha diversidad; sin embargo, todas aquellas ubicadas entre estos valores y pertenecientes a este mismo grupo, también denotan variabilidad entre sí e incluso, entre sus propias diluciones.

En cuanto a aquellas quimeras cuyas resistencias no fueron posibles determinar para una o ambas diluciones o MICs (tabla 8, en rojo), resulta importante destacar, que las razones pudieron ser diferentes para cada caso.

Al no ser posible fijar valores para ninguna de las diluciones de los MICs correspondientes a **ITB-58**, ni reportar crecimiento esperado en LB, se especuló sobre un posible fallo en la dilución inicial de esta quimera. Sin embargo, este razonamiento podría no aplicar para lo ocurrido con **ITB-84** (en rosa) e **ITB-87** (en morado). En el caso de estas quimeras y en contraste a lo observado en la dilución de baja densidad del MIC para sólo Cm (figura 48.A), ambas lograron un crecimiento considerado como típico tanto en medio LB (figura 45.B) como en Ampicilina (figura 46.B), lo que

descartaría un error en la elaboración de sus diluciones. Para estas quimeras, se consideró la posibilidad de no haber sembrado la totalidad de las gotas debido al uso de pipetas multicanal como apoyo para este experimento. También, considerando la proximidad entre ambas, se podría pensar en un problema de difusión de antibiótico durante la elaboración de la caja.

Por otro lado, si se compara la tabla de digestión de los híbridos con la de los MICs, resulta interesante que hasta donde se puede observar para este experimento, la mayoría de las quimeras que presentan digestiones totales de entre 284 pb y 351 pb, poseen los MICs con mayor resistencia, siendo el grupo Rojo el más representado (tabla 6, pág. 60). Por su parte, los híbridos con mayor diversidad en la longitud de las secuencias fusionadas, representados por el grupo azul, también exhibieron la mayor variación en los MICs, a pesar de que algunos de ellos comparten valores de digestión similares con elementos del grupo Rojo.

Por ende, y en base a los datos de ambas tablas, se puede decir que se obtuvo una variación aceptable de las librerías truncadas, presentando desde el **1%** al **75%** de digestión de las secuencias fusionadas; sin embargo, el número de las quimeras con números altos de digestión, fue relativamente bajo. Este grupo, representado por **ITB-116** con 736 pb digeridas e **ITB-62** con 660pb, ambos del grupo Azul, también mostraron MICs variables. Mientras que **ITB-62** presentó un MIC correspondiente a **Amp [200 µg/ml] + Cm [>40 µg/ml]** para ambas diluciones, **ITB-116**, tuvo un MIC de **Amp [200 µg/ml] + Cm [40 µg/ml]** para la dilución de alta densidad y **Amp [200 µg/ml] + Cm [20 µg/ml]**, para la de baja, respectivamente (tabla 6, pág. 60 y tabla 8, pág. 72).

En relación a estos hallazgos, es probable que en la selección de las quimeras por Cm, la CAT se desestabilice al encontrarse fusionada a una secuencia inmediata muy digerida y por tanto afectada, a nivel conformacional, en su dominio Rossmann. Así, es importante recalcar que ésta podría ser una razón viable por la cual tanto **ITB-116** como **ITB-62**, reconocidas como las quimeras con el mayor número de digestiones totales, lograron no sólo ser seleccionadas por dicho antibiótico, sino además obtener MICs incluso más altos que aquellos con menor número de pb digeridas, como **ITB-35** (con tan solo 300 pb truncadas y a la vez, el valor más bajo de MIC); y es que poseen a su vez las secuencias menos digeridas (y menos modificadas) de la secuencia *aroE*. Considerando que dicha secuencia se sometió al truncamiento en su extremo N-terminal, y que las digestiones en ambas quimeras incluyeron únicamente 9 pb y 99 pb, afectando entre **3** y **33** residuos aprox. del dominio N-terminal constituido por 101 residuos, se puede afirmar que no se afectó el dominio Rossmann, constituido a su vez por los residuos 102 – 271.

Así, el hecho de que híbridos con un número igual o similar de pares de bases digeridas posean resistencias muy diferentes, como en el caso de **ITB-45** e **ITB-29**, ambas con 313 pb digeridas (la primera con un MIC de **Amp [200 µg/ml] + Cm [>40 µg/ml]**, la segunda con un MIC de **Amp [200 µg/ml] + Cm [10 µg/ml]**), podría deberse a modificaciones particulares de los residuos dadas por cortes en zonas específicas de la proteína. Tales modificaciones, que podrían incluso cambiar el marco de lectura, afectarían la interacción de dichos residuos con el resto de la proteína, que a su vez podrían alterar la conformación del plegamiento y el de la CAT, reflejándose en las diferencias de resistencia a los antibióticos. Así, aunque el número total de pb sea el mismo para dos quimeras, las zonas de corte varían para cada gen y por ende, para cada caso.

Por consiguiente, y pese a la modificación de la sección inicial del dominio N-terminal, se podría decir que: la independencia (hasta cierto punto) de este dominio C-terminal, la posibilidad de que dichas alteraciones se hayan presentado en zonas no indispensables para la termodinámica global del plegamiento (y por tanto de la solubilidad de las proteínas), y la fusión de éste último con *ydiB*, pudo ser lo que en conjunto, permitió a CAT desempeñar su papel como reportero de plegamiento y a su vez, facultó la selección de ambas quimeras mediante resistencia a Cm.

En referencia a lo anterior, resulta interesante el hallazgo del laboratorio en el 2010: el intercambio de dominios puede generar modificaciones estructurales que impiden el plegamiento de proteínas [Chenge, 2010]. Chenge, construyó las quimeras entre ambas proteínas por intercambio de sus dominios N y C terminal. Así, obtuvo EY (dominio N-terminal de AroE y dominio C-terminal de YdiB) y YE (dominio N-terminal de YdiB y dominio C-terminal de AroE); ambas, construidas en el plásmido pT4 y fusionadas a CAT en su dominio C-terminal. Estas quimeras, a pesar de presentar un MIC de hasta 140 $\mu\text{g/ml}$ a cloranfenicol (indicando una solubilidad comparable a los genes silvestres fusionadas a CAT), no exhibieron actividad catalítica en el ensayo de complementación. A partir de un análisis de las estructuras de ambas proteínas, donde se pudo observar que el dominio N-terminal de éstas es completado por una estructura de horquilla α helicoidal en el extremo C-terminal (correspondiente a las hélices $\alpha 9$ y $\alpha 10$ encargadas de empaquetar la hoja β junto con $\alpha 1$), se planteó la posibilidad de una afectación al dominio de unión al sustrato de ambas quimeras (y por ende a la función) al no ser considerada para las construcciones. En base a este descubrimiento, Espinosa construyó las quimeras EB (dominio N-terminal de AroE de *E. coli* y C-terminal de AroE de *Bacillus subtilis*) y BE (dominio N-terminal de AroE de *Bacillus subtilis* y C-terminal de AroE de *E. coli*). Junto con las quimeras BEB (dominio N-terminal de B, C-terminal de E, cola de B) y EBE (dominio N-terminal de E, C-terminal de B, cola de E), construidas por Martínez, analizó su plegamiento y función encontrando que: aunque EB y BEB no se expresaron en *E. coli* (ésta última probablemente por la insolubilidad de la cola B) y BE (la más insoluble) no presentó función; EBE, la quimera producto de la recombinación entre homólogos con el más bajo porcentaje de identidad, presentó actividad *in vivo* e *in vitro* y exhibió un MIC $< 225\mu\text{g/ml}$ de cloranfenicol. Con este trabajo, se confirma que, la concordancia en templados entre el dominio N-terminal y la cola ($\alpha-9$ y $\alpha-10$) resultan imprescindibles para la formación de una quimera soluble, estable y funcional [Espinosa, 2010].

Así, extrapolando el hallazgo al presente trabajo, se puede decir que la estabilidad estructural o la obtención de un reportaje de plegamiento exitoso por CAT, no son inherentes a la actividad catalítica de las quimeras. En este caso particular, resulta posible que los dominios de unión a sustrato en la mayoría de las quimeras obtenidas mediante recombinación por ITCHY, no se encontraran correctamente empaquetados, aun cuando presentaron resistencias variadas al cloranfenicol a razón de su unión a CAT. Y aunque no se llevaron a cabo experimentos para determinar la actividad de las mismas, existen altas probabilidades de que no fueran funcionales.

Como se pudo observar, la CAT reportó valores altos de resistencia para el MIC de Amp+Cm (de ambos grupos) de manera indistinta para quimeras con altas y bajas tasas de digestión total (la mayoría, todavía indeterminados). A la par, y como ya se mencionó previamente, los valores de Cm en éste MIC fueron idénticos a los del MIC con sólo este antibiótico, (de manera tal que pareciera no existir una diferencia notable en la presión ejercida sobre el crecimiento de las bacterias en presencia de uno o dos antibióticos). Lo anterior, junto con el hecho de que, partiendo de 18 quimeras obtenidas, sólo se lograron seleccionar 2 con digestiones considerables a partir de su resistencia a

Cm y Amp, se podría deber en parte a que la CAT esté reportando expresión para proteínas que no se encuentran muy bien plegadas.

Considerando esta posibilidad, resultaría factible deducir que CAT no discrimine entre proteínas bien plegadas y aquellas medianamente, e incluso, mal plegadas, por lo que tal vez sería necesario repetir el experimento con un reportero de expresión más fino.

Por último, y en relación al método utilizado, resulta importante resaltar que no todas las condiciones referidas en el presente trabajo para la obtención de quimeras a partir de ITCHY, fueron montadas como Ostermeier recomienda en sus artículos, debido a que las condiciones de cada experimento fueron diferentes y porque la metodología debió ser ajustada a las proteínas en cuestión, así como a los reactivos, materiales y maquinaria del laboratorio. Parte de la investigación científica radica en adaptarse a la enzima con la cual se está trabajando, por lo que de manera inherente, el manejo del modelo de estudio, tenderá a variar.

CONCLUSIONES

- ✓ El linker juega un papel importante para CAT como reportero de expresión. La presencia de la secuencia de unión fusionada a la secuencia a reportar, le permite a CAT una mayor libertad y flexibilidad conformacional. Esta “ventaja” espacial, se traduce en la optimización de la actividad de CAT como reportero de plegamiento, reflejada en una mayor resistencia al Cloranfenicol.
- ✓ La construcción del control pT4-CAT, así como la presencia de controles positivos y negativos, resultaron indispensables para el análisis y caracterización de las construcciones.
- ✓ La adaptación del protocolo ITCHY a las condiciones específicas del laboratorio, me permitió generar un banco de variantes quiméricas de las enzimas AroE y YdiB.
- ✓ Mediante el método ITCHY, logré obtener 18 proteínas híbridas, de las cuales 2 de ellas: ITB-116 e ITB-62 presentaron el mayor número de pares de bases digeridas: 736 pb y 660 pb, respectivamente. Mediante el cálculo de MIC, se determinó una concentración mínima inhibitoria de **Amp [200 µg/ml] + Cm [40 µg/ml]** para **ITB-116**, y de **Amp [200 µg/ml] + Cm [>40 µg/ml]** para **ITB-62**, para las diluciones de alta densidad.
- ✓ Las librerías obtenidas para ambos genes, presentaron una variación de longitud aceptable, con digestiones que fueron desde **1%** al **75%** de la totalidad de las secuencias.
- ✓ En base a los recientes hallazgos del laboratorio, resulta probable que las 18 quimeras obtenidas mediante ITCHY, presenten alteraciones de plegamiento a nivel del dominio N- terminal de unión a sustrato, al no considerarse las colas correspondientes a las hélices α -9 y α -10 (determinantes en su buen empaquetamiento) en su recombinación. Sin embargo, habría que llevar a cabo análisis detallados sobre las interacciones particulares de dichas estructuras, para explicar las altas resistencias al Cm. La teoría anterior, también podría explicar en parte el bajo número de quimeras obtenidas luego de varias rondas de ITCHY y estrategias de selección.
- ✓ La CAT como reportero de plegamiento, mostró limitaciones al reportar expresión (conferir resistencia al cloranfenicol) de manera indistinta tanto en quimeras bien plegadas, como en híbridos con plegamientos incompletos, o mal plegados.

PERSPECTIVAS

En primer lugar, será necesario determinar la actividad enzimática de AroE (purificada o de extracto bacteriano) en las diferentes construcciones para su posterior comparación con la proteína silvestre y de esta manera, contar con un punto de referencia sobre los cambios ocurridos en las propiedades catalíticas de dicha proteína al formar parte de una quimera.

Posteriormente, se proponen una serie de adiciones, deleciones y cambios de dominios o estructuras para la generación de diferentes escenarios y por ende resultados, que nos conduzcan a un mayor entendimiento de dichos sistemas de proteínas, como:

- Eliminar el dominio N-terminal de AroE para su caracterización por resistencia a diferentes concentraciones de cloranfenicol así como para la observación de la actividad enzimática de las cepas con sólo un dominio, el C-terminal.
- Generar nuevas fusiones a CAT con diferentes longitudes y tipos de conectores, y así determinar de qué manera afecta esto a su actividad como reportera de plegamiento.
- Complementar el dominio correspondiente al plegamiento Rossmann con dominios de otras proteínas no homólogas o secuencias de tamaño similar al del N-terminal extirpado, para incrementar la resistencia al antibiótico cloranfenicol.
- Fusionar CAT a una proteína con limitaciones en el plegamiento previamente conocidas y caracterizar dicha construcción como control negativo.

En cuanto a las concentraciones mínimas inhibitorias, sería recomendable determinar nuevamente el MIC de las construcciones así como de las quimeras ITCHY, con mayores concentraciones de antibióticos e incluso, con otros cultivos celulares y reporteros de plegamiento.

Por otro lado, se sugiere comprobar la expresión de las quimeras obtenidas mediante ITCHY, por SDS-PAGE y Western Blot y determinar la actividad *in vivo* de las mismas, mediante ensayo de complementación en cepas con el gen *aroE* deletado.

Así mismo, sería interesante llevar a cabo varias vueltas de ITCHY, modificando algunas variables e incluso, sometiendo las construcciones ITCHY obtenidas, a un SCRATCHY o a nuevos procedimientos de recombinación con el fin de explorar un mayor espacio de secuencia, y así caracterizar quimeras con varios puntos de entrecruzamiento.

Por último, se recomienda ampliamente analizar de manera previa, las secuencias codificantes para las estructuras de horquilla (colas) del plegamiento Rossmann, para la obtención de quimeras funcionales en futuros experimentos con la metodología ITCHY.

ANEXO

ALINEAMIENTO MAFFT

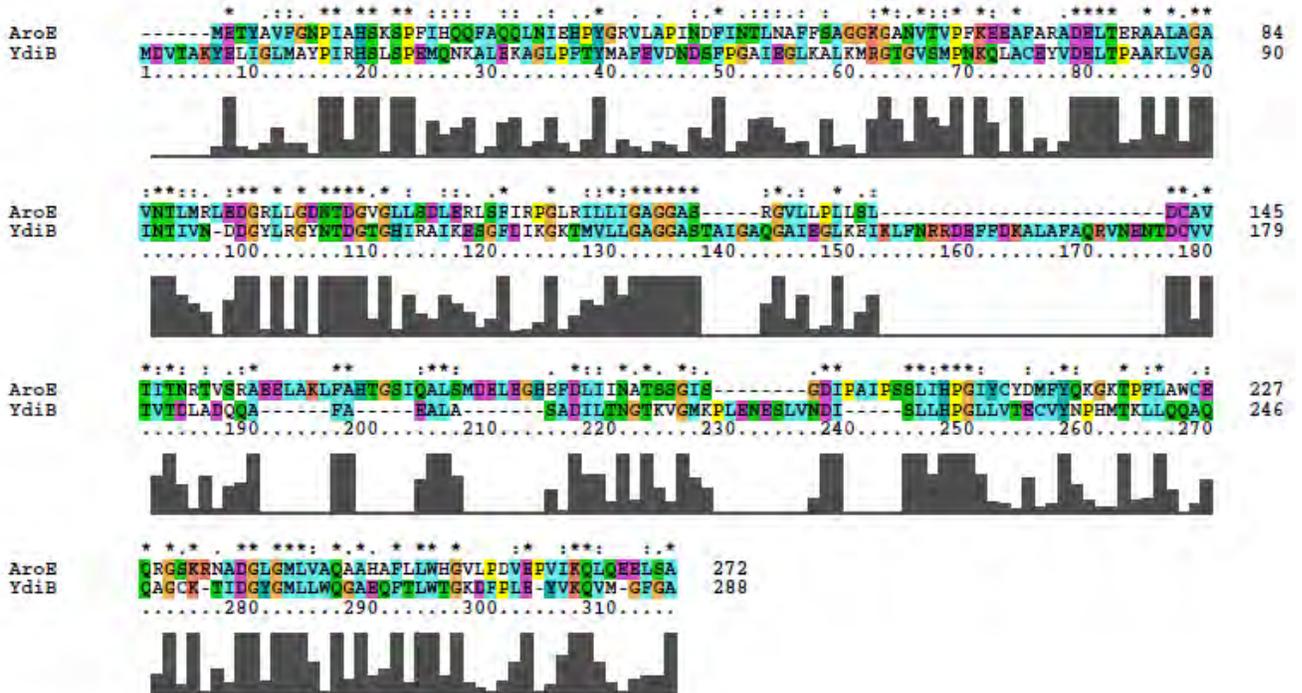


Fig. 51. Alineamiento MAFFT de las secuencias de AroE y YdiB. Las barras en gris indican el porcentaje de conservación de los residuos. La identidad de secuencia es del 27.3%.

TABLA DE OLIGONUCLEÓTIDOS

NOMBRE	TM (°C)	SECUENCIA (5' → 3')
NdeAroE	69	TCA GGT CAT ATG GAA ACC TAT GCT GTT TTT GGT
BamHIAroE	77	AGC ACC GGA TCC CGC GGA CAA TTC CTC CTG CAA TTG
BamCAT	72	CGC TGA GGA TCC GAG AAA AAA ATC ACT GGA TAT ACC
XhoICAT	80	CGC ACC CTC GAG TTA CGC CCC GCC CTG CCA CTC
pT4 *	56	GAC ATA TAA ACG GTT CTG GCA
CAT100*	65	CTG AAC GGT CTG GTT ATA GG
NdeCAT2Cnt	70	CGC TGA CAT ATG GAG AAA AAA ATC ACT GGA TAT ACC
KpnICAT	72	TCC TAA GAG CTC TTT GGT ACC TAA CTC GAG TTA CGC
pT4CATRev	63	GAC GGC CAG TGA ATT GTA ATA
SacIydiB2	75	GAG TTA GAG CTC AGG AGG TTG ACC TAT GGA TGT TAC CGC AAA ATA CGA ATT
EPKydiB R	80	GCA TTT GGT ACC TTT TCC CTG CAG CCT GCA GAA TTC TCA GGC ACC GAA CCC CAT GAC CTG
T3*	60	CGC ATT TAA CCC TCA CTA AAG
T7*	56	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG
M13 F*	62	GTT TTC CCA GTC ACG AC
M13 R*	65	AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GGA

Tabla 9. Oligonucleótidos empleados, ya sea construidos durante el proyecto o previamente existentes (*).

TABLA DE PLÁSMIDOS

NOMBRE	LONGITUD (PB)	CARACTERÍSTICAS GENERALES
ITB- 116	4494	<p>Es el vector representativo de entre 18 quimeras resultantes del método ITCHY realizado a los plásmidos pT4-aroE-CAT y pBSSK-ydiB. Contiene los genes truncados <i>aroE</i> y <i>ydiB</i> fusionados entre sí y mantiene la secuencia completa de <i>cat</i>, por lo que no sólo es resistente a Ampicilina por el marcador de resistencia ya existente e intacto en el plásmido pBSSK-ydiB, sino también al Cloranfenicol. Cuenta con un total de 4494 pares de bases de las cuales 717 corresponden a <i>aroE</i> y 230 a <i>ydiB</i>. Las secuencias de ambos genes, junto con la de <i>cat</i>, se encuentran clonadas en dirección contraria al origen de replicación <i>f1(-)</i> y entre los promotores de transcripción T7 y T3, siendo éste último, el correspondiente para las secuencias de interés.</p>
pBSSK^{-*}	2958	<p>Es un vector de expresión que contiene el marcador de resistencia a Ampicilina y origen de replicación pUC. Presenta el promotor transcripcional plac y los promotores T7 y T3 flanqueando el sitio de múltiple clonación. La zona de apareamiento del oligo M13 forward, se localiza antes del inicio del promotor T7, mientras que el sitio de apareamiento del oligo M13 reverse, se encuentra antes del inicio del promotor T3, que va en sentido contrario a T7. En el sitio M13 reverse, se encuentra parte del promotor lac, también en sentido reverso.</p>
pBSSK-ydiB	3766	<p>Vector que contiene el gen <i>ydiB</i> de 867 pb, flanqueado en su inicio por el sitio <i>SacI</i>, y al final por los sitios <i>EcoRI</i>, <i>PstI</i> y <i>KpnI</i>. El promotor de <i>ydiB</i> es T3, por lo que la secuencia se encuentra insertada en sentido contrario al origen de replicación del plásmido. Resistente a Ampicilina.</p>

<p>pT4*</p>	<p>2018</p>	<p>Vector de expresión que contiene el marcador de resistencia a Kanamicina y origen de replicación pUC. Es un plásmido con alto número de copias que también contiene al promotor transcripcional medianamente fuerte ptrc.</p>
<p>pT4-aroE-CAT</p>	<p>3494</p>	<p>Vector con cassette de resistencia a Kanamicina que posee entre sus sitios NdeI y BamHI la secuencia del gen <i>aroE</i> de 816 pb (con codón de inicio y sin codón de término), que se encuentra fusionada al gen <i>cat</i> de 657 pb (sin codón de inicio, ni cola de histidinas y con codón de término) entre los sitios BamHI y XhoI, y que por tanto, también confiere a este vector resistencia al Cloranfenicol.</p>
<p>pT4-aroE-CATk</p>	<p>3478</p>	<p>Vector con las mismas características que la construcción pT4-aroE-CAT, con la diferencia de que entre los sitios XhoI y SacI, se modificó la secuencia para introducir un sitio KpnI. Resistente a Kanamicina por el marcador propio del vector, y a Cloranfenicol por CAT.</p>
<p>pT4-aroE-I-CAT</p>	<p>3554</p>	<p>Vector con cassette de resistencia a Kanamicina que posee entre sus sitios NdeI y BamHI, la secuencia del gen <i>aroE</i> de 816 pb (con codón de inicio y sin codón de término), y entre los sitios BamHI y XhoI, el “linker” o secuencia conectora de 33 pb fusionada al gen <i>cat</i> de 657 pb (sin codón de inicio, con 27 pb correspondientes a la cola de histidinas y con codón de término), que también le confiere a este vector, resistencia al Cloranfenicol.</p>
<p>pT4-CAT</p>	<p>2675</p>	<p>Vector con cassette de resistencia a Kanamicina que posee entre sus sitios NdeI y XhoI, la secuencia del gen <i>cat</i> de 660pb (con codón de inicio, sin cola de histidinas y con codón de término). Por dicha fusión, también es resistente al antibiótico Cloranfenicol. (<i>Control positivo</i>).</p>

<p>pT4-cons-CAT*</p>	<p>3335</p>	<p>Vector con cassette de resistencia a Kanamicina que posee entre sus sitios NdeI y BamHI, la secuencia consenso de PRAI de 597 pb (con codón de inicio y sin codón de término), y entre los sitios BamHI y XhoI, el “linker” o secuencia conectora de 39 pb, fusionada al gen <i>cat</i> de 657 pb (sin codón de inicio, con 27 pb correspondientes a la cola de histidinas y con codón de término), que también le confiere a este vector resistencia al Cloranfenicol.</p>
<p>pT4-PRAI*</p>	<p>~2,651</p>	<p>Vector con cassette de resistencia a Kanamicina que posee la secuencia de PRAI de <i>E. coli</i>. (<i>Control negativo</i>).</p>

Tabla 10. Plásmidos construidos durante el proyecto o donados (*).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ♣ Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. 2010. *Biología Molecular de la Célula*. Ed. Omega. Barcelona. pp 1602.
- ♣ An, Y., Ji, J., Wu, W., Ly, A., Huang, R. & Xiu, Z. 2006. Molecular evolution of adomet synthetase by DNA recombination with a novel Separate-Mixing method. *Mol. Biol.* Vol.40(3):486-492.
- ♣ Arnold, F.H. & Aguinaldo, A. M. 2002. Staggered extension process (StEP) in vitro recombination. pp 235-239. En: B. Y. Chen & H.W. Janes (Eds). *Methods in Molecular Biology*. Vol. 19: PCR Cloning Methods. Totowa, N.J.
- ♣ Benach, J., Lee, I., Edstrom, W., Kuzin, A.P., Chiang, Y., Acton, T.B., Montelione, G.T. & Hunt, J.F. 2003. The 2.3-Å crystal structure of the shikimate 5-dehydrogenase orthologue YdiB from *Escherichia coli* suggests a novel catalytic environment for an NAD-dependent dehydrogenase. *J Biol Chem.*, 278(21):19176-82.
- ♣ Bogarard, L.D. & Deem, M.W. 1999. A hierarchical approach to protein molecular evolution. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 96 (6): 2591-2595.
- ♣ Bottoms, C.A., Smith, P.E. & Tanner, J.J. 2002. A structurally conserved water molecule in Rossmann dinucleotide-binding domains. *Protein Sci.*, 11(9):2125-37.
- ♣ Chenge, M. 2010. Generación de quimeras por intercambio de dominios entre dos proteínas parálogas. Tesis de Licenciatura, U.N.A.M.
- ♣ Espinosa, A. 2010. Obtención de una quimera activa por la recombinación de dominios entre dos shikimate deshidrogenasas. Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas, U.N.A.M.
- ♣ Donn, N.R. 1997. Protein Engineering from a bioindustrial point of view. *Current Opinion in Biotechnology.*, 8:417-422.
- ♣ Gouy M., Guindon S. & Gascuel O. 2010. SeaView version 4. A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Molecular Biology and Evolution* 27(2):221-224.
- ♣ Han, J., Batey, S., Nickson, A., Teichmann, S. & Clarke, J. 2007. The folding and evolution of multidomain proteins. *Nature Reviews; Molecular Cell Biology.* 8 (4):319-30.
- ♣ Herrmann, K.M. & Weaver, L.M. 1999. The Shikimate Pathway. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol.*, 50:473-503.
- ♣ Kaur, J. & Sharma, R. 2006. Directed Evolution: An Approach to Engineer Enzymes. *Crit Rev Biotechnol.* 26:165-199.

- ♣ Kawarasaki, Y., Griwold, K. E., Stevenson, J. D., Selzer, T., Benkovic, S.J., Iverson, B. L. & Georgiou, G. 2003. Enhanced crossover SCRATCHY: construction and high-throughput screening of a combinatorial library containing multiple non-homologous crossovers. *Nucleic Acids Res.* 31(21):e126:1-8.
- ♣ Lutz, S., Ostermeier, M. & Benkovic, S. 2000. Rapid generation of incremental truncation libraries for protein engineering using α -phosphothioate nucleotides. *Nucleic Acids Res.* 29(4) e16:1-7.
- ♣ Lutz, S., Ostermeier, M., Moore, G.L., Maranas, C.D. & Benkovic, S. 2001. Creating multiple-crossover DNA libraries independent of sequence identity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 98(20):11248-11253.
- ♣ Maclean, J., Campbell, S.A., Pollock, K., Chackrewarthy, S., Coggins, J.R. & Laphorn, A.J. 2000. Crystallization and preliminary X-ray analysis of shikimate dehydrogenase from *Escherichia coli*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 56 (4):512-5.
- ♣ Maxwell, K.L., Mittermaier, A. K., Forman-Kay, J.D. & Davidson, A.R. 1999. A simple in vivo assay for increased protein solubility. *Protein Sci.* 8(9):1908-11.
- ♣ Michel, G., Roszak, A.W., Sauve, V., Maclean, J., Matte, A., Coggins, J.R., Cygler, M. & Laphorn, A.J. 2003. Structures of shikimate dehydrogenase AroE and its Paralog YdiB. A common structural framework. *J Biol Chem.* 278(21):19463-72.
- ♣ Michnick, S.W. & Arnold, F.H., 1999. Itching for new strategies in protein engineering. *Nature Biotech* 17(12):1159-60.
- ♣ Mirny, L.A. & Shakhnovich, E.I. 1999. Universally conserved positions in protein folds: reading evolutionary signals about stability, folding kinetics and function. *J Mol Biol.*, 291(1):177-96.
- ♣ Ostermeier, M., Nixon, A., Shim, J.H. & Benkovic, S.J. 1999 (a). Combinatorial protein engineering by incremental truncation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 96: 3562-3567.
- ♣ Ostermeier, M., Shim, J.H. & Benkovic, S.J. 1999 (b). A combinatorial approach to hybrid enzymes independent of DNA homology. *Nat. Biotechnology*, Vol. 17: 1205-1209.
- ♣ Paschon, D.E. & Ostermeier, M. 2004. Construction of Protein Complementation Libraries Using Incremental Truncation. *Methods Enzymol.*, 386: 103-16.
- ♣ Robben, J., Massie, G., Bosmans, E., Wellens, B. & Volckaert, G. 1993. An *Escherichia coli* plasmid vector system for high-level production and purification of heterologous peptides fused to active chloramphenicol acetyltransferase. *Gene*, 126(1):109-13.
- ♣ Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- ♣ Sieber, V., Martinez, C.A. & Arnold, F.H. 2001. Libraries of hybrid proteins from distantly related sequences. *Nat Biotechnol.*, 19(5):456-60.
- ♣ Singh, S., Stavrinides, J., Chirstendat, D. & Guttman, D. 2008. A phylogenomic analysis of the Shikimate Dehydrogenases reveals broadscale functional diversification and identifies one functionally distinct subclass. *Mol. Biol. Evol.*, 25(10):2221-32.

- ♣ Stemmer, W.P. 1994. DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: in vitro recombination for molecular evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91(22): 10747-10751.
- ♣ Thorner, J., Scott, E. D. & Abelson, J. N. 2000. Applications of chimeric genes and hybrid proteins. Part A: Gene expression and protein purification. *Meth. Enzym.*, 1 (328). Academic Press. London. pp .666.
- ♣ Vogel, C., Teichmann, S. & Pereira-Leal, J. 2005. The relationship between domain duplication and recombination. *J. Mol. Biol.* 20:1-11.
- ♣ Wheeldon, R., Campbell, E. & Banta, S. 2009. A chimeric fusion protein engineered with disparate functionalities-enzymatic activity and self-assembly. *J. Mol. Biol.* 392(1):129-142.
- ♣ Xia, G., Chen, L., Sera, T., Fa, M., Schultz, P. & Romesberg, 2002. Directed evolution of novel polymerase activities: Mutation of a DNA Polymerase into an efficient RNA Polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. 99(10):6597-6602.
- ♣ Ye, S., Delft, F., Brooun, A., Knuth, M., Swanson, R. & McRee, D. 2003. The crystal structure of shikimate dehydrogenase (AroE) reveals a unique NADPH binding mode. *J. Bacteriology*, 185:4144-4151.

APÉNDICE

MEDIOS

LB LÍQUIDO

- 10g NaCl
- 5g Extracto de levadura
- 10g Peptona
- Agua miliQ (aforando a 1 litro)

LB SÓLIDO

- 2.5g NaCl
- 1.25g Extracto de levadura
- 2.5g Peptona
- 3.75 Agar
- 250 ml de agua miliQ

SOC

- 2g Bacto triptona
- 0.5g Extracto de levadura
- 0.05g NaCl
- 75 ml de agua miliQ

A lo anterior, se agrega 1ml KCl 250 mM y se ajusta el pH a 7 con NaOH 4M. Se afora a 100 ml con agua miliQ.

SOLUCIONES AMORTIGUADORAS

TAE 50X

- 242g Tris Base
- 18.6g EDTA₂NA
- 60ml Ac. Acético glacial.

Se afora a un litro de agua miliQ y se ajusta el pH a 7.

KLENOW BUFFER

- 20 mM Tris-HCl
- 100 mM MgCl₂
- pH 8

EXONUCLEASA III BUFFER (10X)

- 660 mM Tris-HCl
- 6.6 mM MgCl₂
- pH 8

En ambos buffers primero se ajustó el pH del Tris- HCl y luego el del MgCl₂. Se utilizó agua tetradestilada estéril en la preparación.

EXONUCLEASA III STOP BUFFER (7.4X)

Dado que este buffer puede ser difícil de preparar, se siguieron las recomendaciones de Ostermeier quien sugiere mezclar los siguientes elementos:

- 5.5 ml de Acetato de Potasio 3M, pH 4.6 (2.94 g de Acetato de Potasio + 2ml de ddH₂O ajustando el pH con 4 o 5 ml de ácido Acético Glacial y llevado a un volumen final de 10ml).
- 25 ml de NaCl 5M
- 0.27 g ZnSO₄ - 7H₂O
- 25 ml de Glicerol al 100% (v/v).

Cabe mencionar que todos los buffers fueron filtrados.