



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

INSTITUTO DE CIENCIAS
INSTITUTO DE CIENCIAS MICROBIÓLOGICAS



**IDENTIFICACIÓN FUNCIONAL DE DOS OPERONES
RELACIONADOS CON LA UTILIZACIÓN DE
CARBOHIDRATOS ESPECÍFICOS DE TEJIDOS DE
ORIGEN ANIMAL, EN *Avibacterium paragallinarum***

Tesis que para obtener el título de

Maestría en Ciencias

Con opción en:

Bioquímica y Genética Microbiana

PRESENTA:

Biól. Alma Gabriela Barcenas Villalobos

DIRECTOR:

Dr. Candelario Vázquez Cruz

CO-DIRECTOR:

Dr. Erasmo Negrete Abascal



DICIEMBRE, 2020

El proyecto de investigación “Identificación funcional de dos operones relacionados con la utilización de carbohidratos específicos de tejidos de origen animal, en *Avibacterium paragallinarum*” se realizó en el laboratorio de Microbiología Molecular y Celular del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas del Instituto de Ciencias, de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, bajo la dirección del Doctor Candelario Vázquez Cruz y el Doctor Erasmo Negrete Abascal.

**“Nada en la vida es para ser temido, es sólo para ser comprendido. Ahora es el momento de entender más, de modo que podamos temer menos”
-Marie Curie-**

La realidad actual que se atraviesa alrededor del mundo ha ocasionado un cambio en muchas de las actividades cotidianas de la vida, desde la forma en que convivimos con los otros, hasta la manera en que realizamos nuestros trabajos, estudios, e investigaciones. Por lo tanto, ha cambiado la forma en la que hacemos ciencia, pero esta no se ha detenido, la ciencia se ha adaptado. Con esto, debimos desarrollar nuevas habilidades, como el uso de las TIC, mantenernos comunicados con nuestros colegas a la distancia, y estamos en proceso también de darle más importancia a nuestro bienestar emocional.

Nos enfrentamos a un virus que no tiene barreras culturales ni económicas, pero que nos demuestra en cada ocasión que los humanos debemos cambiar nuestros paradigmas de convivencia, que debemos poner el foco de atención a las cosas realmente importantes, y que la manera de cuidar a los que amamos es manteniéndonos a distancia de ellos. Estamos aprendiendo a priorizar nuestra salud, con ello también se ha puesto la mirada en la ciencia. La sociedad nos pide dar respuesta y soluciones a esta pandemia, y la comunidad científica se ha comprometido con esta labor. Así como existe un compromiso ético y moral de hacerle frente al COVID-19, el resto de las problemáticas continúan ahí, y nuestro compromiso por entenderlo, y dar soluciones oportunas también.

Al igual que el resto de los trabajos y de todos los contextos donde suceden, los estudios científicos se vieron permeados por esta nueva forma de hacer las cosas. Esto implica una transformación en la forma tradicional de hacer investigación, lo que consecuentemente a afectado muchas de las investigaciones en curso, impidiendo concluir las mismas de manera idónea. Sin embargo, hemos de buscar alternativas que nos permitan sobrellevar dichos obstáculos, como es el uso de herramientas bioinformáticas, siendo el caso de la presente investigación. Por último, si bien las dificultades actuales derivadas de esta pandemia han repercutido, no solo en la ciencia, si no en todos los ámbitos de la sociedad, no debemos desistir en esta lucha que día a día enfrentamos para salir adelante. Por qué...

“La vida no es fácil, para ninguno de nosotros. Pero... ¡Qué importa! Hay que perseverar y, sobre todo, tener confianza en uno mismo. Hay que sentirse dotado para realizar alguna cosa y que esa cosa hay que alcanzarla, cueste lo que cueste”
-Marie Curie-

“Incluso la noche más oscura terminará con la salida del Sol”
-Richard Bach-

Agradecimientos

Primero que nada, quiero agradecer al Doctor Candelario Vázquez Cruz, por aceptarme en su laboratorio y brindarme las herramientas para realizar este proyecto de tesis, por su confianza y su paciencia. Por permitirme explorar este mundo de las ciencias, Gracias.

A mi comité revisor:

Dr. Erasmo Negrete Abascal

Dra. Ma. Patricia Sánchez Alonso

Dr. Luis Javier Martínez Morales

M. en C. Alejandra Espinoza Taxis

Dra. Norma Elena Rojas Ruíz

M en C. Juan Fernando Montes García

Por su tiempo dedicado a la revisión de la tesis y sus correcciones

A la M. en C. Elena Cobos Justo, por el apoyo, la guía y acompañamiento en el laboratorio, gracias por tus consejos.

A los profesores de la maestría y sus buenos consejos

A mis compañeros de generación y compañeros de laboratorio

A CONACYT por la beca de maestría.

Proyecto apoyado por DGAPA-UNAM, PAPIIT IN219919

Proyecto apoyado por CB-2015-01-259209 del CONACYT

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	V
ÍNDICE DE TABLAS	VI
LISTADO DE ABREVIATURAS.....	- 1 -
RESUMEN.....	- 2 -
INTRODUCCIÓN	- 3 -
Coriza infecciosa.....	- 3 -
Pérdidas económicas	- 4 -
La bacteria <i>Avibacterium paragallinarum</i>	- 4 -
Requisitos de crecimiento	- 5 -
Medios de cultivo.....	- 5 -
Serotipificación de AVPG.....	- 6 -
Vacunas.....	- 7 -
Secuenciación de genomas.....	- 7 -
ANTECEDENTES.....	- 9 -
Factores de virulencia.....	- 9 -
Toxina RTX	- 9 -
Hemaglutinina.....	- 10 -
Proteasas.....	- 10 -
Vesículas de membrana externa.....	- 11 -
Fimbrias.....	- 11 -
Biosíntesis de Cápsula.....	- 12 -
Enzimas condroitín liasas.....	- 12 -
JUSTIFICACIÓN	- 14 -
OBJETIVO GENERAL	- 14 -
Objetivos particulares.....	- 14 -
ESQUEMA DE TRABAJO	- 15 -
MATERIAL Y MÉTODOS	- 16 -
Microorganismos y plásmidos	- 16 -
Estrategia de amplificación y clonación de los genes que codifican para condroitín liasa.....	- 17 -
Cambios fenotípicos en las colonias	- 20 -
Clonación y expresión en el plásmido pGLO	- 21 -
RESULTADOS	- 23 -
Análisis bioinformático para el estudio de secuencias relacionadas con condroitín liasas	- 23 -
Diseño de oligonucleótidos	- 27 -
Amplificación de fragmentos chly y clonación en el vector de clonación pBluescript II ks (-)-	- 28 -
Clonación en pQE30	- 35 -
Comparación fenotípica de las bacterias en medios suplementados con Condroitínsulfato	- 36 -
Mapas de las construcciones de pQE30 con insertos de chly I y chly II.....	- 37 -
Amplificación de fragmentos de genes chly I y II para la subclonación al vector de expresión pGLO	- 38 -
.....	- 38 -
DISCUSIÓN	- 40 -
CONCLUSIONES	- 45 -
BIBLIOGRAFÍA.....	- 46 -
ANEXOS.....	- 51 -

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Signos de la coriza infecciosa en aves de corral.....	3 -
Figura 2.- Cultivos de <i>Avibacterium paragallinarum</i>	6 -
Figura 3.- <i>Avibacterium paragallinarum</i> independiente de NAD	6 -
Figura 4.- Esquema de trabajo	15 -
Figura 5.- Esquema representativo del arreglo de los <i>loci</i> de los genes presentes en el operón putativo I	18 -
Figura 6.- Esquema representativo del arreglo de los <i>loci</i> de los genes presentes en el operón putativo II	18 -
Figura 7.- Vector de clonación pBluescript II KS (-) (Stratagene®)	20 -
Figura 8.- Vector de expresión pQE.	21 -
Figura 9.- Vector de expresión pGLO.....	22 -
Figura 10.- Mapa de coordenadas genéticas de los <i>loci</i> de los operones putativos I y II. A).	24 -
Figura 11.- Estructura terciaria de la enzima Condroitín liasa I y II.....	26 -
Figura 12.- Comparación del modelo predictivo de la estructura terciaria de las enzimas condroitín liasas con la proteína plantilla	27 -
Figura 13.- Extracción de DNA genómico de AVPG y amplificación por PCR de fragmentos de los operones <i>chly</i> I.	29 -
Figura 14.- Amplificación por PCR con pTaq de fragmentos del operón putativo II.....	30 -
Figura 15.- Purificación del plásmido pBluescript II KS (-) y digestión enzimática	31 -
Figura 16.- Separación de productos de PCR para la corroboración de la clonación de secuencias de <i>chly</i> I y <i>chly</i> II en pBluescript II KS (-).....	32 -
Figura 17.- Amplificación por PCR de <i>chly</i> I y <i>chly</i> II con las enzimas pTaq y Pfx	33 -
Figura 18.- Liberación de los fragmentos clonados en el plásmido pBluescript II KS (-) con enzimas <i>Bam</i> HI y <i>Pst</i> I. Y extracción de plásmidos de expresión pQE30 y pQE31.....	34 -
Figura 19.- Mapas físicos de las construcciones que contienen los genes <i>chly</i> I y <i>chly</i> II en pBluescript II KS (-).....	35 -
Figura 20.- Verificación de la presencia de insertos de genes <i>chly</i> I y <i>chly</i> II en pQE30	36 -
Figura 21.- Comparación fenotípica de <i>A. paragallinarum</i> y <i>E. coli</i> en medios de cultivo con y sin condroitín sulfato	37 -
Figura 22.- Mapas físicos de las construcciones que contienen los genes <i>chly</i> I y <i>chly</i> II en pQE30.-	38 -
Figura 23.- Amplificación de los genes de <i>chly</i> I y <i>chly</i> II y del plásmido pGLO por PCR.....	39 -

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Cepas de <i>Escherichia coli</i>	- 16 -
Tabla 2.- Plásmidos de clonación y expresión	- 17 -
Tabla 3.- Oligonucleótidos diseñados para amplificación de diferentes fragmentos <i>chly</i>	- 28 -
Tabla 4.- Fragmentos amplificados por PCR y fragmentos clonados en el vector de clonación pBluescript II KS (-).....	- 30 -
Tabla 5.- Construcciones obtenidas en el vector de clonación pBluescript II KS (-) con diferentes insertos de DNA que contienen genes que codifican proteínas del operón de las condroitín liasa I y II	- 34 -

LISTADO DE ABREVIATURAS

°C	Grados centígrados
aa	aminoácidos
Amp	Ampicilina
AVPG	Avibacterium paragallinarum
BHI	Infusión cerebro y corazón }
CO ₂	Dióxido de carbono
CS	Condroitín sulfato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
D.O	Densidad óptica
DS	Dermatán sulfato
EDTA	Ácido etilen-diamino-tetra-acético
GAG	Glucosa-aminoglicanos
IPTG	Isopropil- β- D- tiogalactopiranosido
kbp	kilopares de bases
kDa	Kilo Dalton
HI	Inhibición de la hemaglutinación
h	Hora
KCl	Cloruro de Potasio
Km	kanamicina
LB	Medio de cultivo Luria- Bertani
M	Molar
mM	Milimolar
Mb	Mega base
mg	Miligramos
µg	Microgramos
µm	Micrómetro
ml	Mililitro
mm	Milímetro
NaCl	Cloruro de Sodio
NAD	Nucleotide Adenine Dinucleotide (por sus siglas en ingles)
ng	Nanogramos
orf	Marco de lectura abierto (del inglés open reading frame)
rpm	Revoluciones por minuto
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
SDS	Dodecil sulfato de Sodio
TBE	Regulador de Tris-boratos-EDTA
TEMED	Tetrametiletildiamina
V	Voltios
sp	Especie
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β-D-galactopiranosido

RESUMEN

Avibacterium paragallinarum es una bacteria Gram negativa patógena de aves, que causa una enfermedad en aves de corral conocida como coriza infecciosa, la cual se caracteriza por producir estornudo, lagrimeo, hinchazón en cabeza y ojos, escurrimiento nasal, pérdida de peso y disminución en la producción de huevo, ocasionando pérdidas económicas importantes en el sector avícola. Para controlar la coriza infecciosa se han producido vacunas, sin embargo, estas protegen a las aves de las infecciones producidas por serotipos homólogos a los incorporados en la vacuna, quedando vulnerables a los otros serotipos de *A. paragallinarum*. Se propone que es necesaria la búsqueda de nuevos factores de virulencia que permitan la generación de vacunas y que ofrezcan una mayor protección contra la coriza infecciosa. En algunas bacterias se ha reportado la presencia de enzimas condroitín liasas que se encargan de degradar sulfato de condroitina a oligosacáridos y posteriormente asimilarlos metabólicamente. El objetivo de este estudio fue la identificación funcional de dos operones relacionados con la utilización de carbohidratos de origen en tejido animal, en *Avibacterium paragallinarum*. Mediante análisis bioinformáticos se reportó la presencia de dos enzimas condroitín liasas, a partir de los cuales se diseñaron oligonucleótidos para la amplificación de secuencias de dos operones putativos que contienen genes de condroitín liasas. Se hicieron 11 diferentes amplificaciones con tamaños que van desde 2573 a 5373 nucleótidos. Con estas secuencias se obtuvieron 6 construcciones distintas en pBluescript II ks (-). Dos fragmentos clonados en pBluescript II KS que corresponden a los orf completos de los genes *chly I* y *II*, se subclonaron en el vector pQE30 para la sobreexpresión de las dos condroitín liasas. Mediante un análisis bioinformático se realizó la predicción de la estructura terciaria de las proteínas con el fin de determinar los aminoácidos que constituyen el sitio activo de las enzimas Chly; se encontró conservada la tétrada catalítica Tyr-His-Arg-Glu presente en otras enzimas Chly, también se encontró en estas enzimas que el fenotipo de las clonas de *E. coli* que contienen *chlyI* y *chlyII* clonados en pBluescript II KS (-) y cultivadas en medio LB enriquecido con condroitín sulfato, no presentaron diferencias respecto a la cepa sin construcciones. Los genes clonados por separado no generan cambio en el fenotipo colonial en presencia de sulfato de condroitina, estos resultados sugieren la necesidad de un promotor diferente, o una probable dependencia de los dos genes.

INTRODUCCIÓN

Coriza infecciosa

La coriza infecciosa es una enfermedad del tracto respiratorio superior de aves de corral, que se caracteriza por producir estornudo, secreción e inflamación nasal, lagrimeo, anorexia y diarrea (Figura 1). Esta enfermedad está relacionada con la disminución en el consumo de alimento y agua lo que provoca retardo en el crecimiento de las aves jóvenes y al mismo tiempo disminuye la producción de huevos (1). La coriza infecciosa es producida por una bacteria patógena llamada *Avibacterium paragallinarum* (AVPG), de esta enfermedad se han reportado variantes clínicas como el síndrome de cabeza hinchada y la coriza infecciosa complicada; casos en los que hay coinfección de *A. paragallinarum* y otros patógenos como *Mycoplasma gallisepticum*, *M. synoviae*, *Pasteurella spp.*, *Salmonella spp.* y el virus de la bronquitis infecciosa. En algunos casos se ha observado diseminación de *A. paragallinarum*, pudiendo producir sepsis y artritis, las evidencias han reportado el aislamiento de esta bacteria en hígado y riñón. La enfermedad puede verse exacerbada por el estrés de los animales (1).

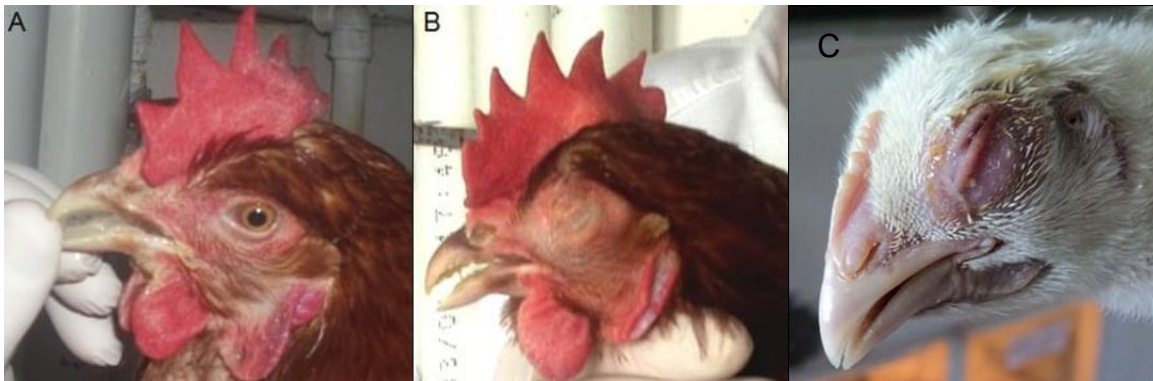


Figura 1.- Signos de la coriza infecciosa en aves de corral. A) Inflamación del seno infraorbitario y el abundante moco espeso al abrir el pico. B) Hinchazón de la cara, los ojos cerrados con párpados adheridos, secreción nasal y ocular y moco en la cavidad bucal. C) Hinchazón de la cara, secreción ocular, ojos cerrados con párpados adheridos e intensa inflamación de los párpados. Tomado de Cigoy, *et al.* (2).

Pérdidas económicas

La coriza infecciosa produce pérdidas económicas importantes que se relacionan directamente con el bajo rendimiento de las aves en crecimiento y con la reducción en la producción de huevo (hasta un 40%), así como un impacto significativo en la producción de carne (3, 4). Existen casos en el que la coriza infecciosa se puede desarrollar en presencia de AVPG con otras bacterias e incluso hongos provocando brotes de infecciones asociadas, trayendo como consecuencia mayores pérdidas económicas (4).

Se ha reportado a la coriza infecciosa como la segunda causa de muerte bacteriana en aves de corral después de la salmonelosis (1). Esta enfermedad se considera de tipo cosmopolita, ya que se han reportado casos en países con industria avícola intensiva como Argentina, Australia, Bulgaria, Canadá, Egipto, Gran Bretaña, Guatemala, Holanda, India, Indonesia, Iraq, Suiza, Estados Unidos de América y México (5).

La bacteria *Avibacterium paragallinarum*

AVPG pertenece a la familia *Pasteurellaceae*, la cual es representada por microorganismos comensales o parásitos de vertebrados, que pueden sobrevivir pobremente fuera del huésped. El género *Avibacterium* está integrado por 5 especies de bacterias Gram Negativas que crecen como colonias no hemolíticas en medio agar sangre. En cultivos jóvenes las colonias son lisas y brillantes con una coloración grisácea y traslúcidas, en tanto que los cultivos viejos son colonias secas que prácticamente desaparecen del agar. Por las condiciones de cultivo la bacteria se considera mesofílica y facultativamente anaeróbica o microaerófila (3, 6, 7).

AVPG es una bacteria no esporulada, que cuando se encuentran en cultivos de agar de 24 h tienen una apariencia de varillas o cocobacilos cortos de 1-3 mm y de ancho de 0.4 a 0.8 mm. Contienen células pleomórficas y con morfología cocobacilar con tendencia a formar cadenas cortas y en algunos casos filamentosas. En cultivos en caldo suelen presentar forma degradada que aparentan ser manchas de colorantes. En muestras tomadas directamente de pollos con coriza infecciosa se observan formas bacilares más largas con presencia de gránulos metacromáticos, que se pueden observar con azul de metileno (5). Para inducir el

crecimiento de AVPG se hacen cultivos en gelosa sangre con una estría de *Staphylococcus* como cepa nodriza que proporciona NAD y mejora la visibilidad de las colonias de AVPG; así se producen colonias pequeñas, en forma de gotas de rocío de 0.3 mm de diámetro, adyacentes a la colonia nodriza, las colonias son circulares, convexas, con superficie lisa, no pigmentadas ni hemolíticas. Los cultivos de AVPG independientes de NAD, presentan colonias de 1-2 mm de crecimiento satelital (5).

Requisitos de crecimiento

En general la síntesis de Dinucleótido de Adenina Nicotinamida (NAD, Factor V) ocurre a partir del ácido quinolínico o por la vía del ácido nicotínico, sin embargo, algunos miembros de la familia *Pasteurellaceae*, carecen de las vías completas de síntesis de NAD y para crecer deben obtenerlo a partir de fuentes externas, ya sea directamente del medio o a partir de organismos nodriza. En el caso de AVPG la mayoría de las cepas son deficientes en la síntesis de NAD, por lo que los medios son complementados con NAD o se emplea el uso de una colonia nodriza de *Staphylococcus spp.* como proveedor. Otro grupo de cepas de AVPG se han identificado como aislamientos independientes de NAD por ser autosuficientes en su síntesis. Con base al requerimiento de NAD para el crecimiento de AVPG se reconocen dos biovariedades para esta bacteria: a) Dependiente de NAD (Figura 2) y b) Independiente de NAD (Figura 3) (3, 5).

Medios de cultivo

Las cepas de AVPG se desarrollan en condiciones de microaerobiosis o anaerobiosis, agotando el O₂ o incrementando la tensión de CO₂, por ejemplo, son adecuadas las atmosferas producidas con una cámara de CO₂ de 5 a 10%. En estas condiciones de gases el periodo de incubación en base de agar con 10% de sangre desfibrilada de bovino es de 16 a 24 h. Otros medios de cultivo comunes son: infusión cerebro-corazón, infusión de carne de pollo, medio de mantenimiento (HMM), agar de Casman, base de agar para gonococos o agar Columbia. También puede utilizarse la estría de un organismo nodriza como *Staphylococcus epidermidis* en agar con sangre no hemolizada, para demostrar el crecimiento satelital de las colonias que presentan dependencia de NAD (5).

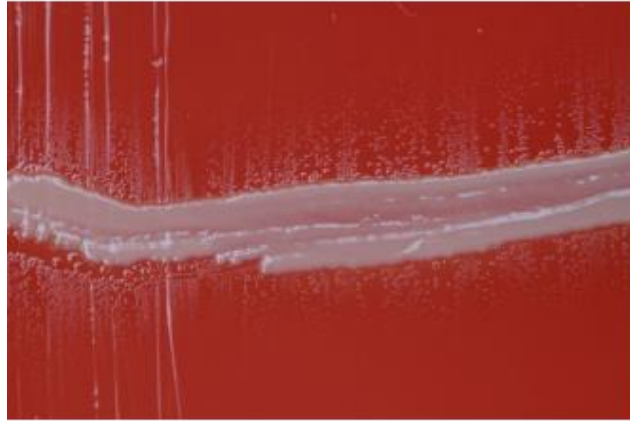


Figura 2.- Cultivos de *Avibacterium paragallinarum* en base de agar con 10% de sangre de ovino con una colonia nodriza de *Staphylococcus epidermidis*. Tomado de Soriano-Vargas *et al.* (3).

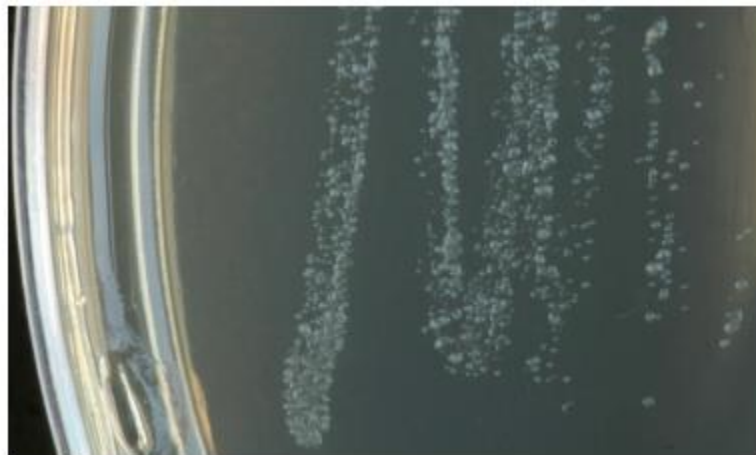


Figura 3.- *Avibacterium paragallinarum* independiente de NAD. Cultivo en placa de agar Balcrace sin sangre, sin colonia nodriza y sin NAD. Tomado de Soriano-Vargas *et al.* (3).

Serotipificación de AVPG

Se han utilizado principalmente dos esquemas diferentes de serotipificación: el de Page y de Kume. El esquema de Page se desarrolló inicialmente como una prueba de aglutinación en placa usando células enteras y antisueros de pollo para los serovares A, B o C. Por otro lado, el esquema de Kume se basa en la inhibición de la hemaglutinación, en la cual, se utilizan eritrocitos fijados de pollo y sueros hiperinmunes de conejo, lo que da como resultado menos aislados no tipificables que la tecnología de aglutinación original, en las cuales se reportan tres serogrupos: I, II y III. Existe una clasificación serológica alternativa de AVPG del esquema de Kume, basado en una prueba de HI que usa células tratadas y sonicadas con

tiocianato de potasio, suero hiperinmune de conejo; este esquema Kume modificado consta de los serogrupos A, B y C que coinciden con los serotipos de Page de A, B y C. Los 9 serotipos de Kume actualmente reconocidos son A-1, A-2, A-3, A-4, B-1, C-1, C 2, C-3 y C-4. (1, 4, 8).

Vacunas

Algunas vacunas contra la coriza infecciosa son bivalentes porque están preparadas contra los serogrupos A y C, proporcionando protección cruzada entre estos, sin embargo, no protegen contra la serovariedad B, ya que algunos autores no lo consideraban como un serovar verdadero. Actualmente existen vacunas trivalentes que ofrecen protección contra las tres serovariedades, no obstante estas vacunas contienen cepas reconocidas internacionalmente las cuales no proporcionan protección contra cepas locales de AVPG (1). Sakamoto *et al.* (9) demostraron que las vacunas recombinantes tienen eficiencia comparable a las vacunas de células enteras inactivadas; al mismo tiempo se reportó que estas vacunas pueden producir efectos secundarios en la aves de corral tal como lesiones necróticas e hinchazón en el tejido en donde se aplica la vacuna (10), mientras que en el caso de las vacunas recombinantes no se encontraron efectos secundarios en las aves de corral (9).

Las vacunas contra la coriza infecciosa se aplican entre las 10 y 20 semanas de edad y producen óptimos resultados cuando se aplican entre 3 y 4 semanas antes de un brote natural de coriza infecciosa. Cuando se aplican bacterinas a las aves en crecimiento, los inmunógenos reducen las pérdidas por enfermedad respiratoria complicada. Con las vacunas de AVPG se ha observado que las aves mantienen una inmunidad significativa durante aproximadamente 9 meses después de su administración (3, 4).

Secuenciación de genomas

Hasta el momento se han reportado 43 genomas de AVPG en la base de datos de GenBank, considerando al genoma de la cepa JF4211 como referencia para esta especie. Este genoma contiene un tamaño de 2.87 Mb, un porcentaje de GC del 40.9% y se han deducido 2374 genes que codifican para proteínas. El genoma de la cepa AVPG 2015 cuenta con un tamaño de 2.51 Mb, un porcentaje de GC del 40.9%, y un total de 2311 genes que codifican para

proteínas y con un total de 24 contigs (11); este genoma recientemente ha sido circularizado por Cobos-Justo *et al.*, (2020, MIMOCE-ICUAP; Datos no publicados). El análisis de los genomas de AVPG permite observar el contenido de genes presentes, los que quizás se expresen en la bacteria. A partir de la información de estos genomas se ha tratado de hacer la identificación de genes que pudieran fungir como factores de virulencia (12). Así mismo, de la información de los genomas se pueden deducir genes que codifiquen para algunos factores putativos de virulencia como lipopolisacárido, cápsula, toxinas y adhesinas, entre otros.

ANTECEDENTES

Factores de virulencia

Un factor de virulencia es cualquier componente de un organismo que le proporciona la capacidad de generar una enfermedad, de esta manera puede determinar la patogenicidad del organismo sin la necesidad de ser prescindible para él. Los factores de virulencia están involucrados en la interacción huésped-patógeno, ya que participan en la colonización, adquisición de nutrientes y evasión del sistema inmune del huésped al debilitar los mecanismos de defensa (13, 14). Algunos factores de virulencia reportados en AVPG son toxinas RTX, hemaglutinina, cápsula, proteasas, metaloproteasas, y fimbrias, entre otros (15, 16).

Toxina RTX

Mediante un análisis bioinformático del genoma de AVPG se encontró la presencia de un operón similar al que codifica para la toxina RTX. Las toxinas RTX (Repetición de la toxina estructural) son toxinas proteicas formadoras de poros producidas por bacterias Gram negativas patógenas, que se caracterizan por presentar un operón organizado con un patrón de genes CABD, en el que C codifica la proteína de activación, A codifica la toxina estructural y B y D codifican las proteínas involucradas en el sistema de secreción tipo I. Muchas de estas toxinas tienen actividades hemolíticas y citotóxicas, y pueden unirse a las integrinas e inducen apoptosis en las células diana. Se ha reportado que las toxinas RTX son factores de virulencia en miembros de la familia *Pasteurellaceae* (17, 18). En un trabajo reportado por Pan *et al.* (15), se encontraron en AVPG cuatro genes que registraron como *avxIC*, *avxIA*, *avxIB* y *avxID*, los cuales codifican para una proteína similar a la toxina RTX.

Se encontró que la proteína estructural AvxIA contiene un dominio peptidasa S8 y un dominio de proproteína convertasa P, la peptidasa está presente en una proteasa que presenta una tríada catalítica Asp / His / Ser, que es similar a la de la tripsina. Estas proteasas juegan un papel importante en la nutrición bacteriana e invasión del huésped. El dominio P de la proproteína convertasa con frecuencia se encuentra río abajo del dominio peptidasa S8 y participa en el plegamiento de peptidasa S8. La presencia de estos dos dominios en AvxIA sugieren que podría ser miembro de la familia peptidasa S8. Los productos de los genes de

este operón pueden estar relacionados con la patogénesis de enfermedades y potencialmente representan candidatos útiles como vacunas para *A. paragallinarum* (15).

Hemaglutinina

La proteína hemaglutinina (HA) juega un papel clave en la inmunogenicidad y patogenicidad de AVPG. En diversos estudios se ha reportado que las aves que se encontraban inmunizadas con el antígeno HA purificado o proteínas recombinantes presentaban protección hacia AVPG, al mismo tiempo se reportó que una mutante que carecía del antígeno HA no presentaba patogenicidad, corroborando que HA es importante para la virulencia e inmunidad de AVPG. En trabajos realizados por Takagi *et al.* (19) y Sakamoto *et al.* (9) se reportaron dos potenciales proteínas HA, la HagA de 39 KDa y la proteína HMTp210 de 210 kDa. Sólo se demostró que esta segunda proteína es un antígeno protector efectivo. En otro estudio reportado por Wang *et al.* (20) demostraron que HMTp210 es el principal antígeno de AVPG, ya que cuando AVPG carece de esta proteína pierde actividad de HA y de esta manera no se logró inducir anticuerpos HI en pollos sometidos a inmunización, pero se demostró que esta proteína está involucrada en la adhesión bacteriana a células huésped. Aunado a esto se encontró que también ayuda a comprender porque los anticuerpos contra HI son protectores con infecciones como la rinitis. Como dato adicional se informó la formación de biofilms y HMTp210 como factor importante para la formación de biopelícula (20).

Proteasas

Algunos microorganismos patógenos de mucosa secretan proteasas que degradan los diferentes componentes de la mucosa del huésped, como la inmunoglobulina A e inmunoglobulina G (IgA e IgG), así las proteasas permiten la colonización de los tejidos y la evasión de los sistemas de defensa del huésped. En el caso de AVPG se ha reportado la secreción de proteasas en cultivos *in vivo*, el cual presenta supuesto sitio transmembrana de anclaje. Esto es similar a lo reportado en *A. pleuropneumoniae*, en donde se cree que esta ubicación posiblemente permite la asociación lipopolisacárido-proteasa y explica la resistencia bacteriana, lo que permite clasificar esta proteasa como metaloproteasa. Las proteínas secretadas por AVPG degradaron parcialmente IgG de pollo, por lo tanto, esta

actividad de la proteasa reportada podría considerarse como un factor de virulencia porque de esta manera permite a los patógenos de mucosa evadir el sistema inmunológico u obtener nutrientes. Las proteasas bacterianas, particularmente las producidas por patógenos, actúan como factores tóxicos para sus huéspedes y han sido implicados en virulencia y en la patogenicidad. Muchas de estas proteasas bacterianas son metaloproteasas que contienen zinc (21).

Vesículas de membrana externa

Las bacterias Gram negativas están conformadas por dos membranas, la membrana externa y la membrana plasmática, las cuales se encuentran separadas por un espacio periplásmico, en el cual están presentes diferentes componentes estructurales y algunas enzimas. Por medio de sus componentes estructurales, las bacterias Gram negativas han desarrollado diversos sistemas de secreción. Un ejemplo de esto son las vesículas de membrana (MVs) que se secretan en condiciones normales de crecimiento (22). En bacterias patógenas, algunos factores de virulencia pueden ser transportados a través de la membrana hacia el espacio extracelular por medio de las MVs. En el trabajo realizado por Ramón-Rocha *et al.* (23) se reportó la presencia de MVs en cultivos jóvenes de AVPG, las cuales se encontraban asociadas a las células y otras liberadas al medio. Dentro de estas MVs se encontraron proteínas que podrían ser toxinas RTX y proteínas inmunogénicas, la presencia de estas vesículas de membranas indica que estas estructuras podrían ser utilizadas como componentes para la generación de vacunas, ya que al mismo tiempo dentro de estas estructuras se encontró la presencia de ácidos nucleicos que podrían ser resultado de transferencia de información genética a otras cepas (23).

Fimbrias

Las fimbrias son filamentos proteicos presentes en la superficie de muchas bacterias patógenas. Estos filamentos proteicos participan en la adhesión a las células huésped y resulta de gran importancia para la virulencia. Se ha reportado que en algunas bacterias patógenas como *Escherichia coli* y *Gallibacterium anatis*, las fimbrias son candidatos potenciales para vacunas. El ensamblaje común de las fimbrias bacterianas requiere de cuatro proteínas estructurales, la proteína chaperona, la proteína Usher, la proteína adhesina y la proteína

fimbrial. La familia fimbrial tipo F17, se divide en cinco grupos genéticos distintos: FlfA, Flf1A, Flf2A, Flf3A y Flf4A, dentro del cual FlfA se ha reportado en *G. anatis* como un factor de virulencia. En el caso de AVPG, Liu *et al.* (24) encontraron que al hacer mutantes sin la presencia de FlfA se disminuye la virulencia de AVPG, así mismo, al inmunizar pollos con FlfA se generaba protección contra la infección, por lo cual se sugiere que FlfA podría ser considerado como un factor de virulencia y un posible antígeno para la vacuna de *A. paragallinarum*.

Biosíntesis de Cápsula

Muchas bacterias patógenas cuentan con una cápsula de polisacáridos en la superficie exterior. Estos polisacáridos ofrecen a las bacterias protección contra la fagocitosis y la muerte mediada por el complemento, por lo que son considerados importantes para la virulencia bacteriana (16). Entre los componentes de la cápsula se encuentran los Glucosaminoglicanos (GAG), los cuales son polímeros lineales, compuestos de un disacárido repetitivo que típicamente comprende una hexosamina N- y un residuo de ácido urónico.

Los GAG de manera general se clasifican en cuatro tipos: hialuronato, condroitín sulfato (CS) / dermatán sulfato (DS), heparán sulfato / heparina y queratán sulfato (16, 25). CS y DS son los GAG más comunes presentes en tejidos de origen animal, tanto en la superficie celular como en la matriz extracelular. CS es un polisacárido lineal compuesto por unidades disacáridas repetidas de ácido β - d- glucurónico (GlcA) y N -acetil- β - d -galactosamina (GalNAc), las cuales se encuentran unidas a través de un enlace glucosídico β -1,4. El sulfato de condroitina tiene diferentes isómeros que se clasifican en: CS-A, CS-C, CS-D, y CS-E, esto en base a la posición en la que el sulfato está unido (26–29).

Enzimas Condroitín liasas

Se han reportado diversos microorganismos capaces de generar enzimas que degradan los GAG, particularmente aquellos microorganismos que degradan tejido animal (25). En un trabajo realizado por Kitamikado y Lee (27), se aislaron bacterias de los géneros *Aeromonas*, *Vibrio*, *Flavobacterium*, *Beneckea*, *Proteus*, *Micrococcus*, y *Arthrobacter* los cuales

presentaban enzimas condroitin-liasas que degradan el CS en disacáridos, y pueden estar asociadas con la patogenicidad bacteriana.

Se ha reportado la caracterización bioquímica de cuatro enzimas que degradan el CS: 1) condroitina-4-sulfato y condroitina-6-sulfato los cuales pueden ser degradados por la misma enzima (condroitinasa AC o condroitina AC liasa) las cuales se han reportado en *Arthrobacter aurescens*, *Aurebacterium*, *Aeromonas liquefaciens*, *Bacteroides stercoris*, *Flavobacterium columnare* y *Flavobacterium heparinum*; 2) dermatán sulfato (condroitinasa B o condroitina B liasa) que se ha reportado en *F. heparinum*; 3) condroitin-6-sulfato e hialuronato (condroitinasa C o condroitina C liasa), la cual se identificó en *F. heparinum*; y 4) una enzima con una amplia especificidad de sustrato que actúa tanto en la CS como en el DS (condroitinasa ABC o condroitina ABC liasa), y esta se encontró en *B. stercoris*, *Bacillus sp.*, y *P. vulgaris* (25, 28, 30–35). Al mismo tiempo se ha reportado que en el caso de la condroitín liasa ABC se presentan dos tipos de actividades de liasa, aquella que degrada por medio de endoeliminasa (chondroitin sulfate ABC endolyase), y exoeliminasa (chondroitin sulfate ABC exolyase (36). Del mismo modo, hay dos condroitín AC liasa, AC-I (endoliasa) y AC-II (exoliasa) (25, 26).

La condroitín liasa AC posee la capacidad de aceptar cualquier tipo de sustrato en el sitio activo y convertirlos en moléculas nuevas, ya que puede despolimerizar los GAG al extraer el protón C-5 de cualquier sitio de su bloque de construcción de ácido urónico. El mecanismo se basa en la eliminación del protón relativamente ácido del carbono C-5 (centro quiral) del ácido urónico y la liberación de la hexosamina 4- ligada, con la consiguiente generación de un doble enlace C-4-C-5 en el anillo de ácido urónico. Se ha reportado que existe una tétrada (o grupo) de aminoácidos en las enzimas liasas que participan en la degradación del sustrato, la tétrada está conformada por His-Glu-Arg-Tyr. En el caso de la condroitín liasa B, que degrada las regiones de DS que contienen ácido idurónico, la enzima utiliza un ión de Ca^{2+} , con dos Glu y un Asp, mientras que el sitio activo tiene una lisina que se encarga de desprotonar el C-5 y Arg. Para el caso de las condroitin liasas ABC se ha reportado la presencia de dos isómeros en *P. vulgaris*, en las que existe un sitio activo similar al de la condroitín liasa AC (37). Con base en lo expuesto respecto a las enzimas condroitín liasas y

otras estructuras bacterianas relacionadas con la virulencia, es de suma importancia la búsqueda de factores de virulencia en AVPG.

JUSTIFICACIÓN

En *A. paragallinarum* se conocen varios factores de virulencia, de los cuales algunos fueron identificados por evaluaciones experimentales y otros deducidos a partir de la información genómica de estas bacterias. En el laboratorio de Microbiología Celular y Molecular del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas de la BUAP se ha deducido la probable existencia de enzimas condroitín liasa en AVPG, que podrían destruir los tejidos de animales y liberar componentes para la nutrición de la bacteria. De ser así, estas enzimas pueden ser clasificadas como factores de virulencia de esta bacteria.

La biosíntesis de la pared celular y la cápsula de AVPG requiere de Carbohidratos para elaborar N-acetil galactosamina y puede incorporar a los carbohidratos por vía biosintética endógena o por degradación de fuentes exógenas. La captura por vía exógena está documentada en los patógenos *P. mirabilis*, *Vibrio sp.* y *Edwardsiella piscicida* entre otros. El estudio de la importancia de la condroitín liasa de AVPG será relevante para relacionarlo con las infecciones producidas por AVPG, porque quizás con esta enzima la bacteria modifique la estructura de su pared celular y destruya los tejidos del hospedero.

OBJETIVO GENERAL

Identificar la función de dos operones relacionados con la utilización de carbohidratos específicos de origen tejido animal, en *Avibacterium paragallinarum*.

Objetivos particulares

- Amplificar los genes presentes en el operón putativo de Condroitín liasa (*Chly*)
- Clonar los genes *chly I* y *chly II* de los operones putativos que codifican la Condroitín liasa hipotética
- Expresar los genes de la condroitín liasa hipotética

ESQUEMA DE TRABAJO

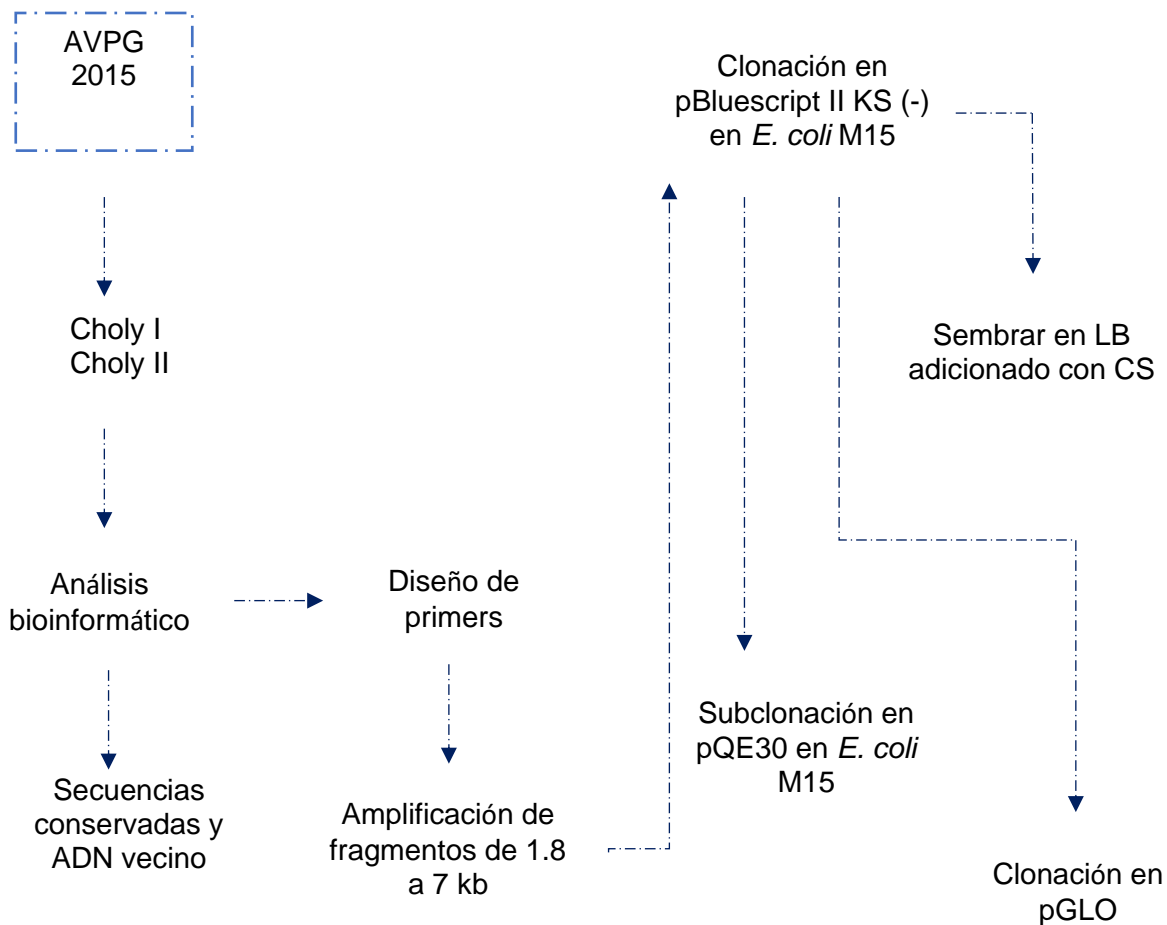


Figura 4.- Esquema de trabajo

MATERIAL Y MÉTODOS

Microorganismos y plásmidos

Se utilizó la bacteria *Avibacterium paragallinarum* cepa 2015 serovariedad B1 y 4 cepas de *E. coli*, las cuales se muestran en la Tabla 1, a su vez, utilizaron tres plásmidos de clonación y expresión que se enlistan en la Tabla 2.

Tabla 1. Cepas de *Escherichia coli*

Cepa	Resistencia	Genotipo	Características	Uso	Origen
DH5a	Ácido nalidíxico	F ⁻ <i>endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG purB20 φ80d lacZ ΔM15 Δ (lacZYA-argF) U169, hsdR17 (r⁻ κ⁻ m⁺ κ⁺), λ⁻</i>	Coloración azul / blanco con lacZΔM15. Alta estabilidad del inserto debido a la mutación recA1. Alto rendimiento y calidad del ADN debido a la mutación endA	Clonación	Invitrogen
M15	Kanamicina (pREP4)	F ⁻ , Φ80ΔlacM15, thi, lac ⁻ , mtl ⁻ , recA ⁺ , KmR	Cis-represión del promotor <i>E. coli</i> T5 (encontrado en vectores tales como pQE o similar), inducible bajo IPTG (represor lac en el plásmido pREP4).	Expresión de proteínas tóxicas.	Quiagen
HB101	Estreptomicina	supE44 ara14 galK2 lacY1 Δ(gpt-proA)62 rpsL20 (Strr) xyl-5 mtl-1 recA13 Δ (mcrCmrr) HsdS ⁻ (r ⁻ m ⁻)	Las células HB101 son rec A ⁻ , que minimiza los eventos de recombinación, y contienen un fondo sin restricción (hsd S20) que permite una mejor representación al clonar ADN metilado.	Clonación	Invitrogen
BL21DE	Cloranfenicol	<i>E. coli</i> B F ⁻ dcm ompT hsdS (rB ⁻ mB ⁻) gal λ (DE3 [lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5]) [malB+]K-12(λS) pLysS[T7p20 orip15A](CmR)	Cepa básica inducible por IPTG que contiene T7 RNAP (DE3)	Expresión general de proteínas	Invitrogen

Tabla 2. Plásmidos de clonación y expresión

Nombre	Tipo de plásmido	Tamaño (pb)	Resistencia	Características
pBluescript II KS (-)	Expresión bacteriana	2958	Ampicilina	Vector de clonación estándar (fagémido extirpado de lambda ZAP). La orientación f1 (-) permite el rescate de la cadena antisentido ssDNA. pBluescript SK (-) y pBluescript KS (-) difieren según la orientación del MCS.
pQE30	Expresión bacteriana	3461	Ampicilina	Promotor T5, Etiqueta 1 con 6xHis, N terminal
pGLO	Plásmido de transformación bacteriana para la expresión regulada de GFP.	5371	Ampicilina	pGLO contiene varias secuencias de ADN que permiten la replicación del ADN plasmídico y la expresión del rasgo fluorescente (fenotipo) en bacterias después de la transformación.

Estrategia de amplificación y clonación de los genes que codifican para condroitín liasa

A partir de la secuencia de AVPG de la cepa 2015 (acceso [PRJNA232651](#)) reportada por Horta *et al.* (11) se encontraron dos genes que codifican para la proteína de condroitín liasa. Mediante un análisis bioinformático se revisaron los genes adyacentes a los genes que codifican para la condroitín liasa. En la Figura 5 y 6 se muestra el arreglo de los *loci* para cada una de las condroitín liasas.

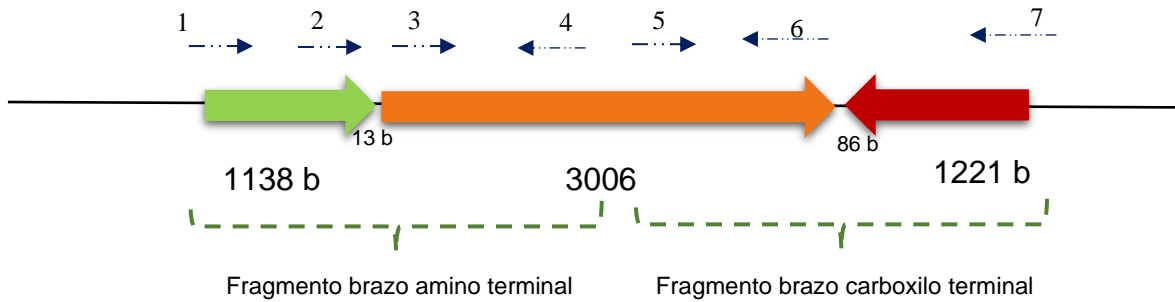


Figura 5.- Esquema representativo del arreglo de los *loci* de los genes presentes en el operón putativo I. La flecha naranja representa el gen que codifica para la condroitín liasa putativa, la flecha verde representa el gen que codifica para una Porina putativa y la flecha roja representa un gen que codifica para un Simportador sodio/ glutamato. El tamaño del operón putativo es de 5464 nucleótidos. Las flechas punteadas y los números sobre las flechas representan la ubicación y el número de los oligonucleótidos diseñados.

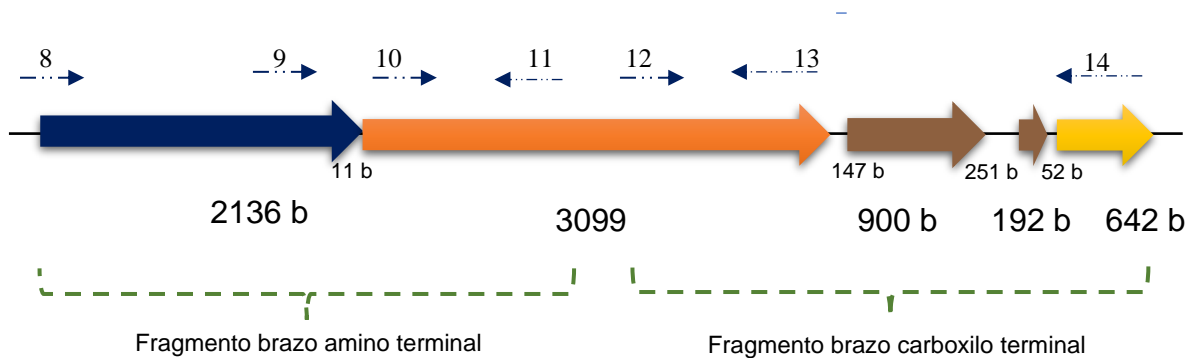


Figura 6.- Esquema representativo del arreglo de los *loci* de los genes presentes en el operón putativo II. La flecha naranja representa el gen que codifica para la condroitín liasa putativa, la flecha verde representa el gen que codifica para un Autotransportador de la proteína que contiene el dominio de barril beta de la membrana externa, las flechas rojas los genes que codifican para proteínas hipotéticas y la flecha amarilla para un gen que codifica para Autotransportador de la proteína que contiene el dominio de barril beta de la membrana externa. Las flechas punteadas y los números sobre ellos representan la ubicación y el número de los oligonucleótidos diseñados para la amplificación de las secuencias. El tamaño del operón de 7430 nucleótidos.

Mediante el programa BPPROM de Softberry®, se realizó un análisis de reconocimiento de un promotor bacteriano σ^{70} , el cual proporciona las posibles posiciones de inicio de la transcripción de genes bacterianos regulados por este tipo de promotores. También se hizo un análisis bioinformático de la proteína y del sitio activo en los programas I-TASSER®, ExPaSy® y PyMOL®, con los que se obtuvo la predicción de la estructura terciaria de la proteína, así como los aminoácidos presentes en el sitio activo. También se realizó la comparación con otras proteínas, en donde se obtuvo el TM-score que indica la similitud entre la estructura generada y la estructura de referencia, así como porcentaje de identidad de secuencia.

A partir del programa SnapGene® de Insightful Science, se diseñaron 6 pares de oligonucleótidos para amplificar los fragmentos de los 2 operones putativos que contienen genes que codifican para proteínas condroitín liasa. Se diseñaron dos pares oligonucleótidos para la amplificación respectiva de los genes que codifican para la condroitín liasa I y condroitín liasa II y por último se diseñaron oligonucleótidos para la apertura del plásmido pGLO (Bio-Rad®) y para la ligación de los genes que codifican para la condroitín liasa I y II a este plásmido. Así mismo, en el diseño de los oligonucleótidos se agregaron secuencias con sitios de restricción *BamHI* y *PstI*. Los genes que codifican para las proteínas condroitín liasa I y II, así como los genes vecinos del operón putativo fueron amplificados por medio de una PCR punto final (Anexos) con Taq polimerasa y posteriormente re-amplificados con una enzima de alta fidelidad *Pfx* (Invitrogene®).

Una vez obtenidos los fragmentos con extremos romos estos se ligaron 3 μ l de vector de clonación pBluescript II KS (-) (Stratagene®) con 6 μ l de inserto y 1 μ l enzima T4-DNA ligasa (5 U/ μ l) Invitrogen® (Estados Unidos de América) (Figura 7). Posteriormente, mediante transformación por choque térmico se clonó la ligación en células competentes *E. coli* *MI5*. Una vez obtenidas las clonas en el vector de clonación e inserto se extrajo y fenolizó el plásmido y las construcciones se corroboraron por cortes con enzimas de restricción que reconocen los sitios *KpnI* (Thermo Scientific ®).

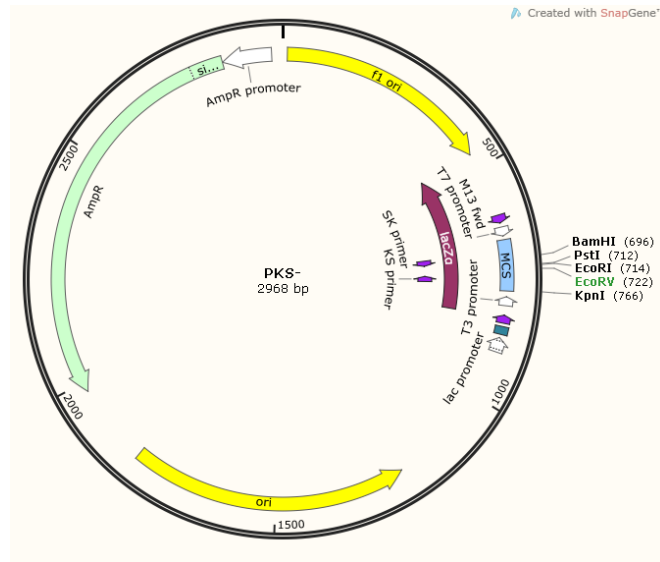


Figura 7.-Vector de clonación pBluescript II KS (-) (Stratagene®). Se muestra el sitio de clonación múltiple (MCS) y el sitio *EcoRV* donde fueron insertados los fragmentos de los genes que codifican para la condroitín liasas.

Se extrajo el inserto de las construcciones anteriores mediante corte con enzimas de restricción *BamHI* y *PstI*. El vector de expresión pQE30 (Quiagen®) se cortó con las mismas enzimas (Figura 8) y se ligaron vector e inserto mediante T4-DNA ligasa (5 U/ μ l). Una vez ligados se clonaron en *E. coli M15* mediante transformación por choque térmico. Las construcciones se verificaron mediante PCR con los oligonucleótidos que se utilizaron para la amplificación de los fragmentos.

Cambios fenotípicos en las colonias

Una vez obtenidas las clonas con el vector de clonación pBluescript II ks (-): Inserto en la *E. coli* cepa *M15*, las clonas se sembraron en medio LB y en medio LB adicionado con Sulfato de Condroitina durante 18 h a 37°C, con el fin de determinar si existía un cambio fenotípico en las colonias con o sin inserto de las diferentes clonas.

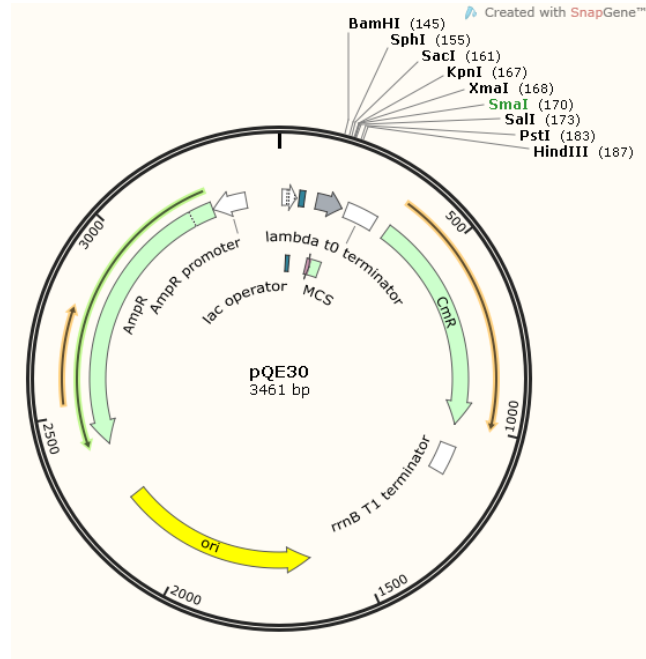


Figura 8.- Vector de expresión pQE. En donde se observa el sitio de clonación múltiple (MCS) y los sitios de restricción en donde fueron subclonados los fragmentos de los genes que codifican para las condroitín liasas

Clonación y expresión en el plásmido pGLO

Para visualizar a la condroitín liasa en caso de tener poca proteína, en el presente trabajo se propuso usar a la proteína verde fluorescente como una etiqueta (239 aa) diferente a 6Xhis, lo que probablemente permitirá observar a la proteína con la etiqueta en geles de poliacrilamida, así como en proteínas concentradas e incluso en experimentos de colonización en animales. Se pretende usar esta proteína verde fluorescente para monitorear la expresión por medio de un marcaje alternativo a las colas de histidinas, por lo cual se utilizó el plásmido pGLO (BIO-RAD®) que contiene esta proteína GFP (Figura 9). Para la subclonación de las proteínas condroitin liasas I y II se diseñaron primers con sitios de restricción BamHI y PstI, al mismo tiempo para su amplificación por PCR, los cuales se ligarán en pBluescript II KS (-), se procederá a la digestión y ligación final en un plásmido pGLO (BIO-RAD®) digerido con las enzimas *BamHI* y *PstI*.

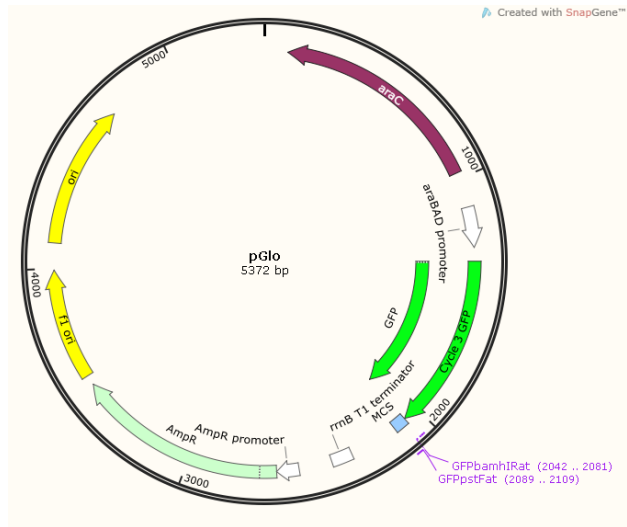


Figura 9.- Vector de expresión pGLO. En donde se observa el sitio de clonación múltiple (MCS), *araC* gen que codifica para una proteína reguladora que controla la expresión del promotor, GFP proteína verde fluorescente, y una región AmpR, que confiere resistencia a ampicilina.

RESULTADOS

Análisis bioinformático para el estudio de secuencias relacionadas con condroitín liasas

El análisis bioinformático del registro en GenBank y con RAST sugiere que los genomas de AVPG CL y AVPG 2015 (Números de acceso GCA_000969315.2 y GCA_000969305.1) contienen dos operones putativos que codifican para proteínas putativas de condroitín liasa (locus TAG VY92_002865 y VY92_011985) (Cobos-Justo 2018; Datos no publicados). La secuencia del gen que codifica para la condroitín liasa I presenta una longitud de 3006 nucleótidos, mientras que la secuencia del gen que codifica para la condroitín liasa II tiene una longitud de 3099 nucleótidos. Las regiones del mapa genómico abarcan del nucleótido 553857 al 556962 para el gen que codifica para la Chly I y del 2458190 al 2461276 para el gen que codifica para la Chly II. Para motivos de este trabajo el nucleótido 1 del operón putativo I corresponde al nucleótido 552779 del gen que codifica para una Porina putativa y el nucleótido 5464 corresponde al nucleótido 558150 del gen que codifica para simportador sodio/ glutamato, mientras que para el operón putativo II el nucleótido 1 corresponde al nucleótido 2456031 del gen que codifica para un autotransportador de la proteína que contiene el dominio de barril beta de la membrana externa y el nucleótido 7430 corresponde al nucleótido 2463162 del gen que codifica para un autotransportador de la proteína que contiene el dominio de barril beta de la membrana; de acuerdo a esta región estudiada para el operón putativo I se estará analizando un segmento de 5464 bases y para el operón putativo II se estará analizando un segmento de 7430 bases (Figura 10).

Mediante el análisis de los operones en el programa BPROM se dedujeron las regiones -10 y -35, en la posición 1119 y 1096 respectivamente para el operón putativo I y las posiciones 1567 y 1585 para el operón putativo II. Se encontraron los promotores en las posiciones 1129 y 1595 para el operón putativo I y II respectivamente, los cuales nos indican la posición del promotor y este se asigna al primer nucleótido de la transcripción (posición del sitio de inicio de la transcripción), la caja -10 y -35 son dos elementos hexaméricos de la secuencia promotora posicionados a 7 bases del inicio, estas secuencias están separadas por una secuencia variable de entre 15 y 21 nucleótidos, sin embargo, se ha encontrado que la distancia óptima es de 17 nucleótidos dado que estos puntos de contacto son los principales entre la proteína RNA pol. y el DNA (38). BPROM también sugiere que hay secuencias que

son reconocidas por posibles factores transcripcionales de tipo *E. coli*, por ejemplo: para el operón putativo I se encontró una secuencia blanco para un activador transcripcional del tipo Fnr en la posición 1075. En el caso del operón putativo se encontró un sitio de unión para el factor de transcripción del tipo OmpR en la posición 1559 (Figura 10).

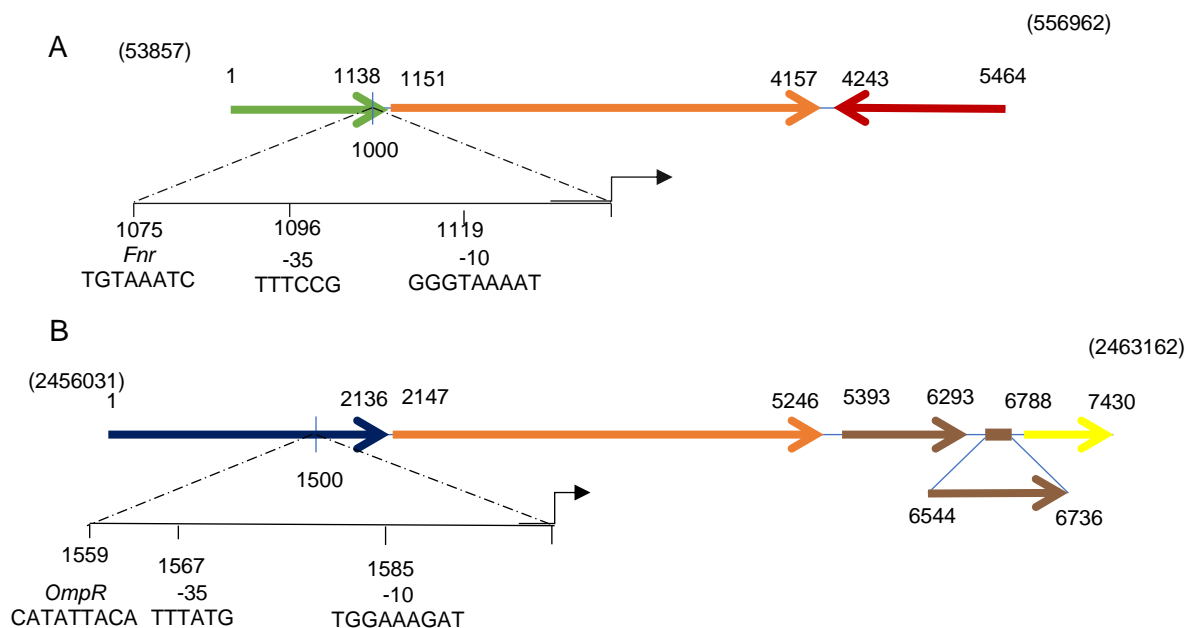


Figura 10.- Mapa de coordenadas genéticas de los loci de los operones putativos I y II. A) Se observa el nucleótido inicial en la posición 1 y el nucleótido final en la posición 5464 para el operón putativo I. B) Se observa el nucleótido inicial en la posición 1 y el nucleótido final en la posición 7430 del operón putativo II. Al mismo tiempo se observan los elementos de las posibles posiciones de inicio de la transcripción por los promotores bacterianos σ^{70} . Entre paréntesis se observan las coordenadas de los loci en la secuencia del genoma. Verde: *porina*, naranja: *condroitín liasas*, rojo: *simportador sodio/glutamato*, azul: *autotransportador de la proteína que contiene el dominio de barril beta de la membrana externa*, café: *proteína hipotética*, amarillo: *autotransportador de la proteína que contiene el dominio de barril beta de la membrana externa*.

Se realizó un análisis bioinformático de las secuencias aminoácidas de las condroitín liasas Chly I y Chly II en los programas I-TASSER, ExPaSy y PyMOL, y se obtuvieron las probables estructuras terciarias y los probables aminoácidos del sitio activo de cada una de las enzimas. La proteína Condroitín liasa I cuenta con una longitud de 1002 aminoácidos, mientras que la proteína condroitín liasa II cuenta con una longitud de 1033 aminoácidos. El sitio activo está conformado por una tétrada catalítica Tyr-His-Arg-Glu. En el caso de la Chly

I se encuentran en las posiciones Tyr472, His465, Arg525, Glu619, mientras que para chly II se encuentran en las posiciones Tyr512, His505, Arg564 y Glu 657. Asimismo, se identificó una His en la posición 355 de la Chly I y en la posición 393 de la Chly II altamente conservada en la estructura terciaria, la cual presenta una distancia entre His-Y (de la tétrada catalítica) mayor a 12 Å (Figura 11). Por otro lado, al comparar dichas estructuras con otras proteínas se obtuvo una TM- score de 0.915 y una identidad de secuencia de 0.301 con una condroitín liasa de *Bacteroides thetaiotaomicron*, mientras que para la condroitín liasa II se obtuvo una TM-score de 0.938 y una identidad de secuencia de 0.504 con una condroitín liasa de *Proteus vulgaris*. Al mismo tiempo se obtuvieron los modelos predictivos de las estructuras terciarias de las Condroitín liasas comparadas con la proteína plantilla como se muestra en la Figura 12.

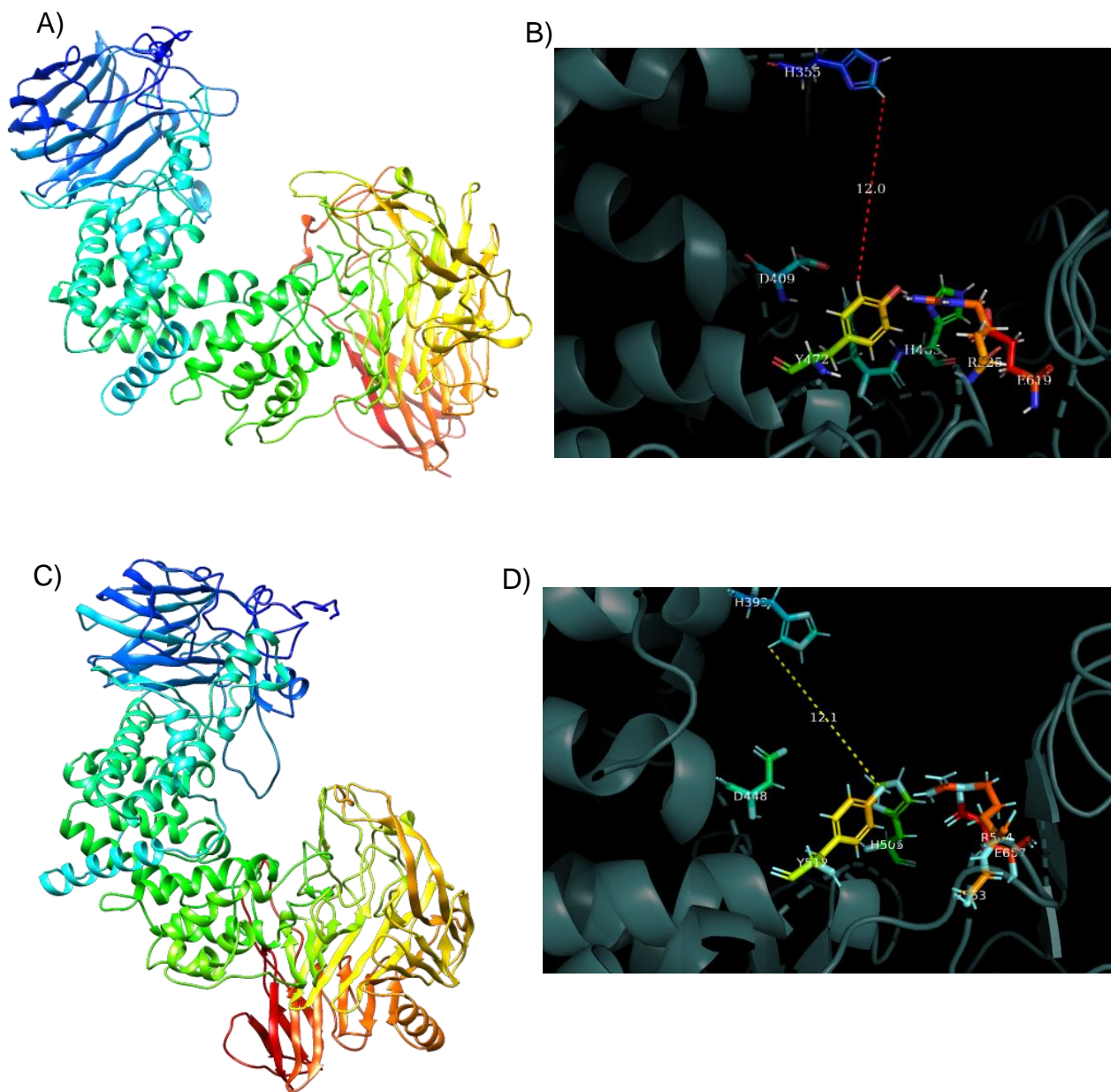


Figura 11.- Estructura terciaria de la enzima Condroitín liasa I y II. A) Estructura terciaria de la proteína condroitín liasa I. B) Sitio activo de Chly I Tyr-His-Arg-Glu. C) Estructura terciaria de la proteína condroitín liasa II. D) Sitio activo de Chly II, se muestran los aminoácidos Tyr-His-Arg-Glu. La región azul en los modelos tridimensionales indica el extremo amino terminal y en rojo el extremo carboxilo terminal. La línea punteada en B y D muestra la longitud entre los residuos de His y Tyr, en ambos casos la distancia mayor corresponde a 12 Å. Diseñado en los programas I-TASSER, ExPaSy y PyMOL.

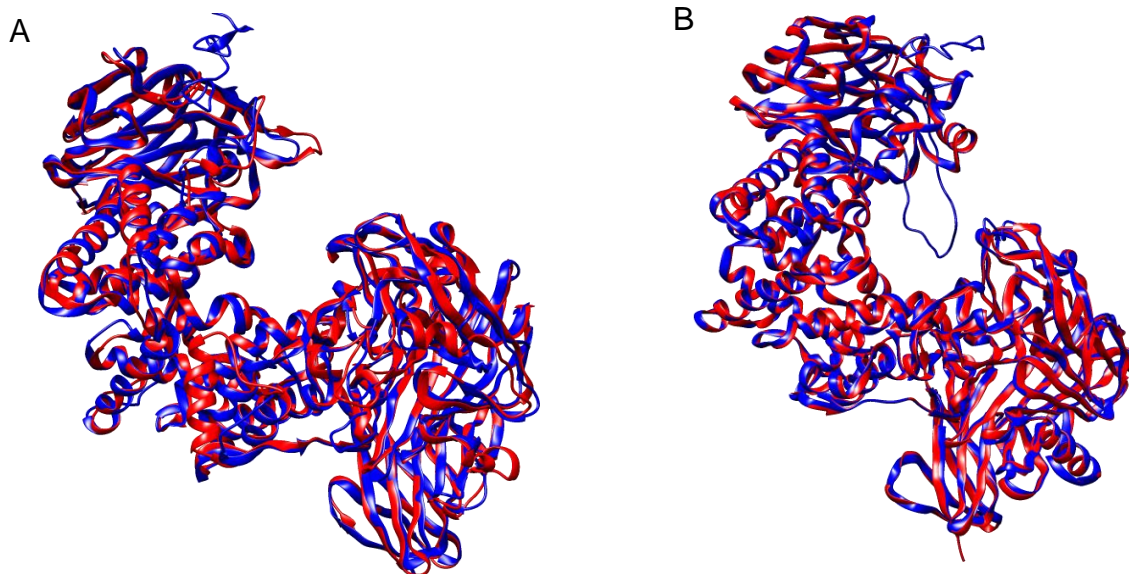


Figura 12.- Comparación del modelo predictivo de la estructura terciaria de las enzimas condroitín liasas con la proteína plantilla. A) Sobreposición de las proteínas Condroitín liasa I (azul) con la proteína Condroitín liasa I ABC de *Bacteroides thetaiotaomicron* (rojo). B) Sobreposición de las proteínas Condroitín liasa II (azul) con la proteína Condroitín liasa ABC I de *Proteus vulgaris* (rojo).

Diseño de oligonucleótidos

Considerando en el DNA las regiones de inicio y final de los operones putativos, y de los orfs de las proteínas condroitín liasa I y II, se diseñaron oligonucleótidos para la amplificación de los diferentes segmentos del operón putativo y del marco de lectura abierto de cada uno de los genes que codifican para la condroitín liasa. Los oligonucleótidos se muestran en la Tabla 3. El orden de los primers se puede ver en la Figura 5.

Tabla 3.- Oligonucleótidos diseñados para amplificación de diferentes fragmentos *chly*

Gen	Oligonucleótido	Secuencia (5' ---> 3')	Número de primer
Condroitín liasa I	cholyA2f	gtt att tca ctg cga cta aat g	6
	cholyA5r	tga ctg cta gtt taa tga tg	3
Condroitín liasa II	cholyB2f	tct gcg gcg ttg gcg gc	10
	cholyB5r	tta ctt ctg caa aat aac ttc ttg	13
Condroitín liasa con sitios <i>BamHI+</i> <i>pstI. I</i>	ChonDirBamH	gga tcc atg aaa gtc aca tta tta tct cg	3
	Chonrevpst	ctg cag tta ttt cac tgc gac taa at	6
Condroitín liasa con sitios <i>BamHI+</i> <i>pstI.</i> II	ChondroDirBamH	gga tcc atg tta gga aaa atg aaa aaa agc	10
	Chondrorevpst	tcc gaa ttc ctg cag ctt ctg caa aat aac	13
Operón puativo I	cholyA1f	atg ctc atc att aaa gta gg	7
	cholyA4r	tga aaa aga cat ttt ctt ttc tg	1
Porina putativa I	PORCORTF	gat gct tgg cgt gtt aca gc	2
Porina putativa II	PORLARF	gta cca agc ttt gat ctg ca	9
Operón puativo II	cholyB1f	atg aaa aag cta caa cga tt	8
	cholyB4r	tta aaa tgc ata ttc aat ac	14
Casete de interrupción I	cholyA3f	tag ctt ctt gag tga gtg cat aag	4
	CholyA6r	gtg gac gtc acc caa cgg gaa aat	5
Casete de interrupción I	cholyB3f	gtg gca ctg cct ttg cgt tg	12
	cholyB6r	att ccc att atg ccg cca agc tg	11
pGLO	GFPpstFat	cct cta gag tgc acc tgc agg	
	GFPbamhiRat	ttc ggt acc gga tcc tttg tag agc tga tcc at	
<i>chly I</i> en pGLO	cholyIpstctR	tcc gaa ttc ctg cag ttt cac tgc gac taa	
<i>chly II</i> en pGLO	cholyIIpstctR	tcc gaa ttc ctg cag ctt ctg caa aat aac	

Amplificación de fragmentos *chly* y clonación en el vector de clonación pBluescript II**ks (-)**

Se extrajo DNA genómico de AVPG cepa 2015 (Figura 13A), el cual se utilizó para la amplificación de los fragmentos *chly* por PCR. La reacción de PCR se estandarizó para cada uno de los fragmentos amplificados; se amplificaron los fragmentos de los genes (Figura 5 y 6) con diferentes combinaciones de oligonucleótidos, así se obtuvieron 11 fragmentos de diferentes tamaños, los cuales correspondieron con la tamaño esperado, como se muestra en las Figuras 13B, 13C y 14. Enlistados en la Tabla 4.

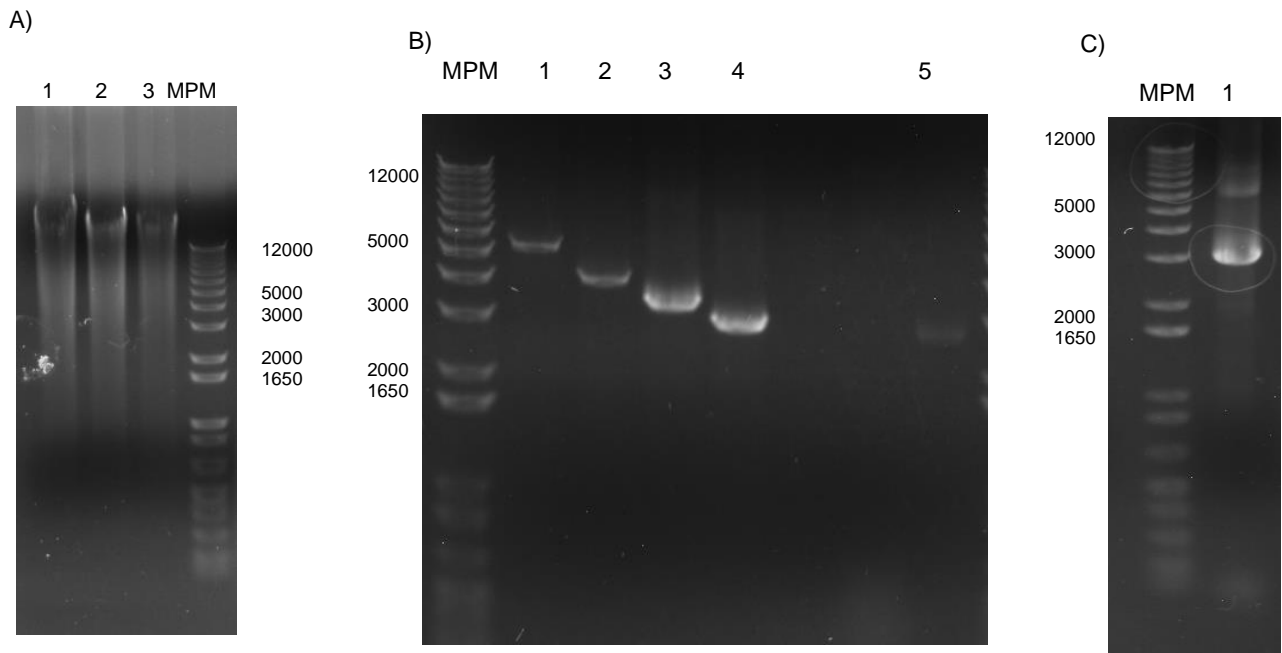


Figura 13.- Extracción de DNA genómico de AVPG y amplificación por PCR de fragmentos de los operones *chly I*. Análisis por electroforesis en geles de agarosa al 0.8%. A) 1, 2 y 3: DNA genómico de AVPG cepa 2015, B) Productos de amplificación del gen *chly I* por PCR con Taq DNA polimerasa. 1: Operón I completo (primers 1 y 7: 5372 pb), 2: *Porina* + *chly I* (primers 1 y 6: 4144), 3: Orf *chly I* + fragmento *porina* (primers 2 y 6: 3377 pb), 4: Orf *chly I* (primers 3 y 6: 3006 pb), 5: Fragmento brazo amino terminal I (primers 1 y 4: 2657 pb). C) Productos de amplificación del gen *chly I* por PCR con Taq DNA polimerasa. 1: Fragmento brazo carboxilo terminal I (primers 5 y 7: 2721). MPM: Marcador de peso molecular -1kb plus lader Invitrogen™.

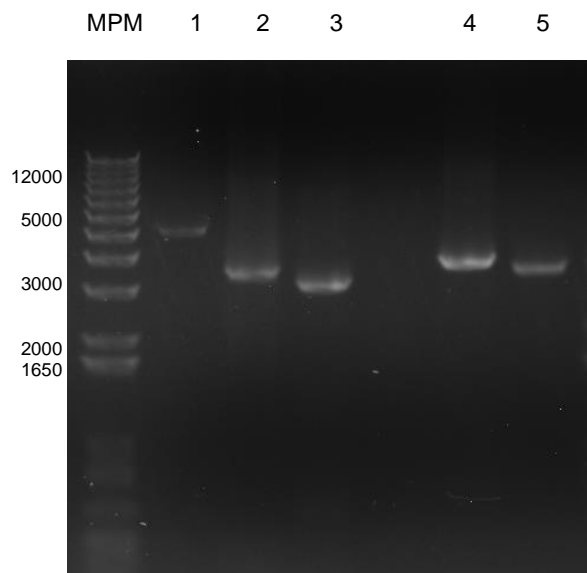


Figura 14.- Amplificación por PCR con pTaq de fragmentos del operón putativo II. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% 1: *autotransportador de la proteína que contiene el dominio de barril beta de la membrana externa + chly II* (primers 8 y 13: 5243 pb), 2: *Fragmento de autotransportador de la proteína que contiene el dominio de barril beta de la membrana externa + chly II* (primers 9 y 13: 3368 pb) 3: *Orf de chly II* (primers 10 y 13: 3099 pb) 4: *Fragmento brazo amino terminal II* (primers 8 y 11: 3683 pb), 5: *Fragmento brazo carboxilo terminal II* (primers 12 y 14: 3743 pb). MPM: Marcador de peso molecular -1kb plus ladder Invitrogen™.

Tabla 4.- Fragmentos amplificados por PCR y fragmentos clonados en el vector de clonación pBluescript II KS (-)

Nombre del fragmento	Números de oligonucleótidos	Tamaño del fragmento	Clonación en pBluescript II KS (-)
pBVOCCI	1-7	5372	
pBVPCI	1-6	4144	
pBVOPCI	2-6	3377	Si
pBVOCI	3-6	3006	Si
pBVIACI	1-4	2573	Si
pBVIBCI	5-7	2727	Si
pBVACII	8-13	5243	
pBVOPCII	9-13	3368	Si
pBVOCII	10-13	3099	
pBVIACII	8-11	3683	
pBVIBCII	12-14	3374	Si

Una vez obtenidos los 11 fragmentos de *chly* I y *chly* II se re-amplificaron por PCR con la enzima *Pfx* para la obtención de fragmentos con extremos romos. El plásmido pBluescript II KS (-) fue purificado y digerido con *EcoRV* y ligado a los productos amplificados con la enzima *Pfx*. Los plásmidos recombinantes se usaron para transformar en células competentes de *E. coli* DH5 α . Se obtuvieron 6 clonas con los fragmentos amplificados de ambos genes, los cuales corresponden al Orf *chly* I + fragmento *porina*, en el cual se encuentra una región promotora que se localiza fuera del marco de lectura abierta formando parte del gen vecino, también se clonaron dos segmentos para lograr la interrupción del gen *chly* I, denominados brazo amino terminal I y el brazo carboxilo terminal I (2). Para el gen *chly* II se obtuvieron: un brazo amino terminal II, *autotransportador de la proteína que contiene el dominio de barril beta de la membrana externa* + *chly* II y el gen *chly* I como se muestra en las Figuras 15 y 16 y enlistados en la tabla 4. En la Tabla 5 se presentan las construcciones obtenidas en pBluescript II KS (-), el tamaño del fragmento obtenido, así como la presencia completa o incompleta del gen Chly dentro de la construcción.

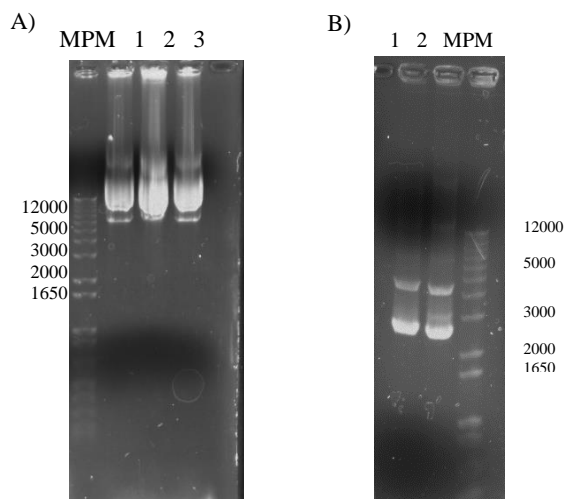


Figura 15.- Purificación del plásmido pBluescript II KS (-) y digestión enzimática. Análisis por electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. Se usó como referencia de tamaño molecular el Marcador de peso molecular -1kb plus ladder InvitrogenTM (MPM). A) Los carriles del 1 al 3 muestran el plásmido pBluescript II KS (-) de tres extracciones independientes. B) Los carriles 1 y 2 muestran la digestión con la enzima *EcoRV* de dos preparaciones del plásmido pBluescript II KS (-).

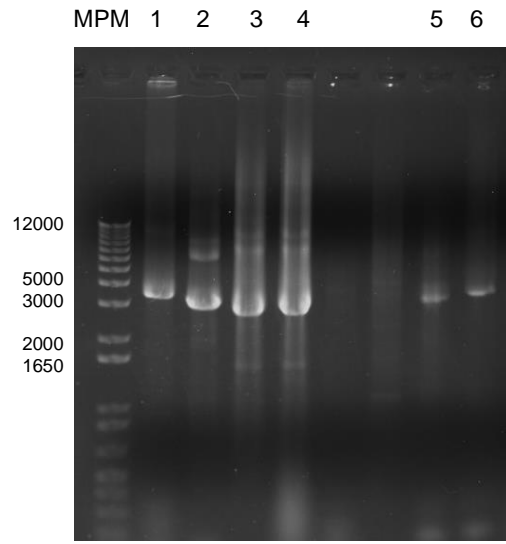


Figura 16.- Separación de productos de PCR para la corroboración de la clonación de secuencias de *chly I* y *chly II* en pBluescript II KS (-). Análisis por electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. Marcador de peso molecular -1kb plus ladder Invitrogen™. 1: Orf *chly I* + fragmento *porina* (primers 2 y 6: 3377 pb), 2: Fragmento amino terminal I (primers 1 y 4: 2657 pb), 3: Fragmento carboxilo terminal I (primers 5 y 7: 2721 pb), 4: Fragmento carboxilo terminal II (primers 12 y 14: 3734 pb), 5: *autotransportador de la proteína que contiene el dominio de barril beta de la membrana externa* + *chly II* (primers 10 y 13: 3368 pb), 6: Orf de *chly I* (oligonucleótidos 3 y 6 : 3006 pb).

Las amplificaciones por PCR se llevaron a cabo con pTaq DNA polimerasa, y posteriormente para obtener fragmentos con extremos romos se re-amplificaron con enzima de alta fidelidad *Pfx* y por último se clonaron los fragmentos relacionados con *chly I* y *II*, a los que previamente se agregaron sitios de reconocimiento para las enzimas *BamHI* y *PstI* (Figura 17).

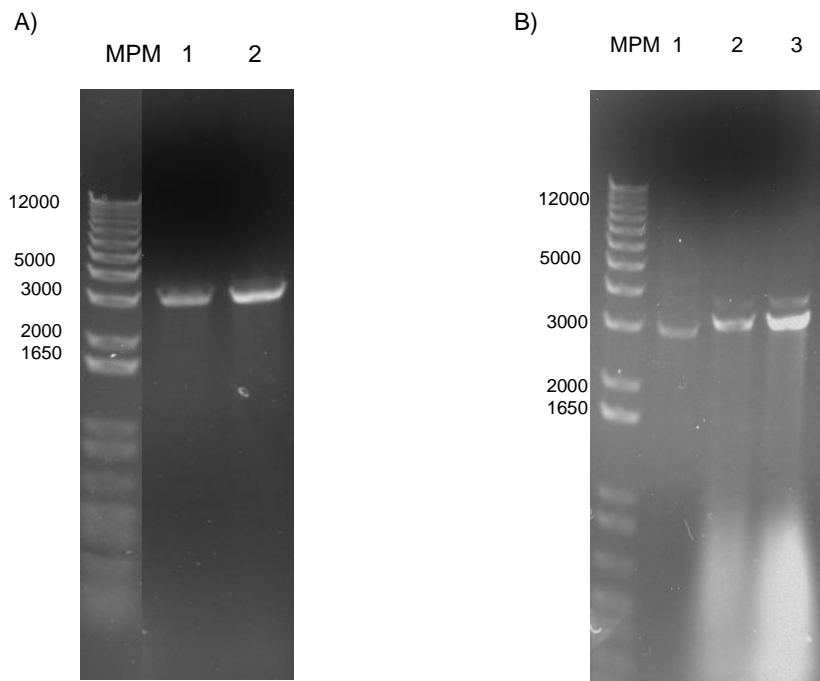


Figura 17.- Amplificación por PCR de *chly I* y *chly II* con las enzimas *pTaq* y *Pfx*. Análisis por electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. Marcador de peso molecular -1kb plus ladder Invitrogen™ (MPM). A) Análisis de productos de PCR obtenidos con la enzima de alta fidelidad *pTaq* 1: Orf *chly I* con sitios *BamHI* y *PstI* (3012 pb) y 2: Orf del gen que codifica para *chly II* con sitios *BamHI* y *PstI* (3104). B) Análisis de productos de PCR obtenidos con la enzima de alta fidelidad *Pfx*. 1: Orf *chly I* con sitios *BamHI* y *PstI* (3012 pb). 2 y 3: Orf *chly II* con sitios *BamHI* y *PstI* (3014 pb).

Posteriormente se obtuvieron dos clones con fragmentos que contienen secuencias de los genes que codifican para la condroitín liasa I y una clona para condroitín liasa II en el vector de clonación pBluescript II KS (-) (Figura 18 y 19).

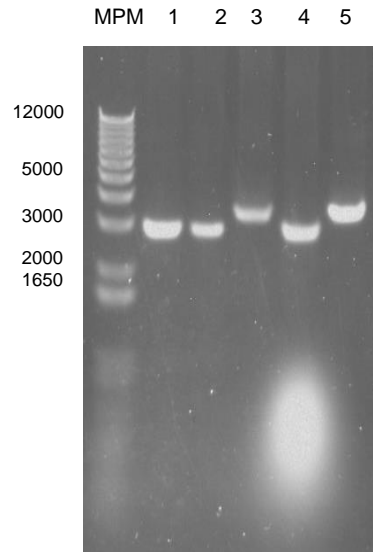


Figura 18.- Liberación de los fragmentos clonados en el plásmido pBLuescript II KS (-) con enzimas *Bam*HI y *Pst*I. Y extracción de plásmidos de expresión pQE30 y pQE31. Análisis por electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. Se usó como referencia de tamaño molecular el Marcador de peso molecular -1kb plus ladder Invitrogen™ (MPM). 1 y 2: Orf de *chly* I con sitios *Bam*HI y *Pst*I (3012 pb), 3: pQE30 con enzimas *Bam*HI y *Pst*I (5372 pb), 4: Orf de *chly* II con sitios *Bam*HI y *Pst*I (3104 pb), 5: pQE31 con enzimas *Bam*HI y *Pst*I (5374 pb).

Tabla 5.- Construcciones obtenidas en el vector de clonación pBluescript II KS (-) con diferentes insertos de DNA que contienen genes que codifican proteínas del operón de las condroitín liasa I y II

Nombre de la construcción	Tamaño en pb del fragmento clonado	Operón	Sitios de restricción	Oligonucleótidos	Tipo de fragmento
pBVOPCI	6345	I	-	cholyA2f/ porcorf	Completo
pBVIACI	5541	I	-	cholyA4r/ cholyA3f	Incompleto
pBVIBCI	5795	I	-	cholyA6r/ cholyA1f	Incompleto
pBVOCI	5974	I	-	cholyA2f/ cholyA5r	Completo
pBVOPCII	6336	II	-	Porlarf/ cholyB5r	Completo

pBVIBCII	6417	II	-	cholyB3f/ cholyB4r	Incompleto
pBVCLI	5986	I	<i>BamHI/ Pst I</i>	ChonDirBamH/ Chonrevpst	Completo
pBVCLII	6079	II	<i>BamHI/ Pst I</i>	ChondroDirBamH/ ChondroDirpst	Completo

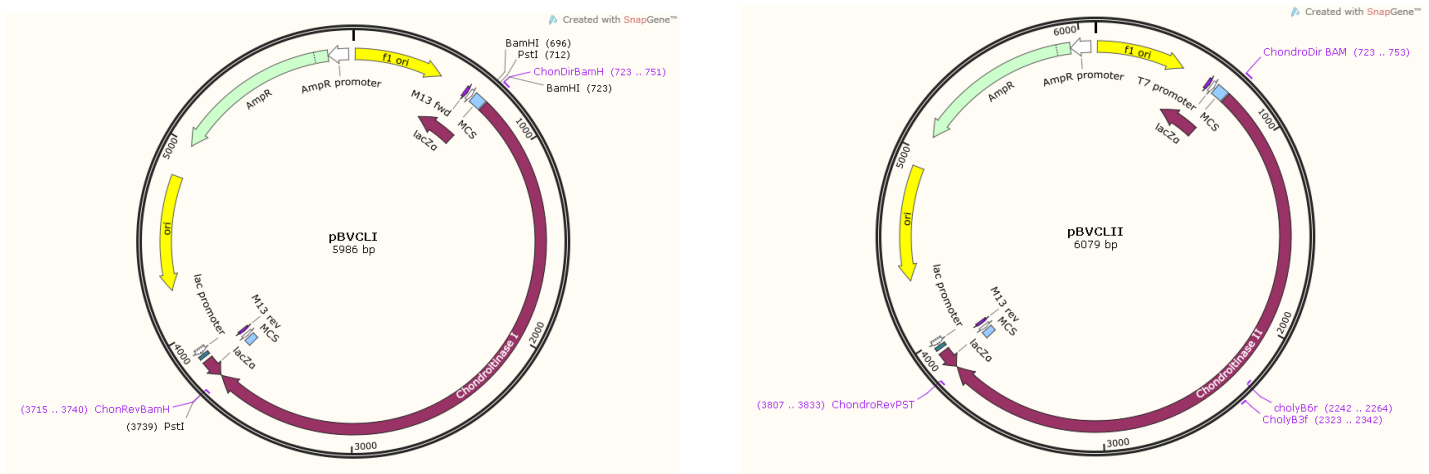


Figura 19.- Mapas físicos de las construcciones que contienen los genes *chly I* y *chly II* en pBluescript II KS (-). **pBVCLI:** orf de *chly I* en pBluescript II KS (-). **pBVCLII:** orf de *chly II* en pBluescript II KS (-).

Clonación en pQE30

Una vez confirmadas las clonas pBVCLI: orf de *chly I* en pBluescript II KS (-). pBVCLII: orf de *chly II* en pBluescript II KS(-), los insertos fueron liberados del vector de clonación mediante el corte con enzimas de restricción, y ligados (subclonados) en el vector pQE30, el cual previamente se abrió con las mismas enzimas de restricción (Figura 18 carril 3), obteniéndose 3 clonas con genes de la condroitín liasa I y una clona de la condroitín liasa II, confirmadas únicamente por medio de una PCR punto final (Figura 20).

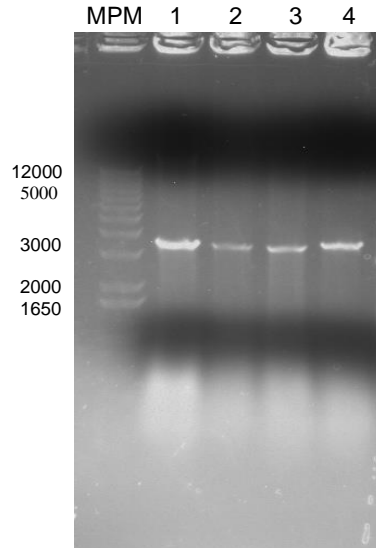


Figura 20.- Verificación de la presencia de insertos de genes *chly I* y *chlyII* en pQE30. Análisis por electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de productos de PCR punto final. Se usó como referencia de tamaño molecular el Marcador de peso molecular -1kb plus ladder Invitrogen™ (MPM). 1, 2 y 3: Plásmido pQE30 de clonas en *E. coli M15* que contiene el fragmento del gen que codifica para la condroitín liasa I. 4: Clona de *E. coli M15* con el plásmido pQE30 que lleva el fragmento del gen que codifica para la condroitín liasa II.

Comparación fenotípica de las bacterias en medios suplementados con condroitín sulfato

Una vez que se obtuvieron las clonas *E. coli M15* en medio LB, se compararon con *E. coli M15* con el plásmido pBluescript II KS (-) con el inserto del gen que codifica para la condroitín liasa I y II en medio LB adicionado con Sulfato de Condroitina. Las cepas se sembraron en medio LB adicionado con Sulfato de Condroitina para observar si al tener presente cada uno de los genes, estas presentaban un cambio fenotípico (aumento en el tamaño de las colonias), el cual se observa al sembrar AVPG en medio BHI adicionado con Sulfato de Condroitina, sin embargo, en el caso de las clonas no presentaron una diferencia fenotípica en comparación con *E. coli* sin presencia de plásmido, tal como se observa en la Figura 21.

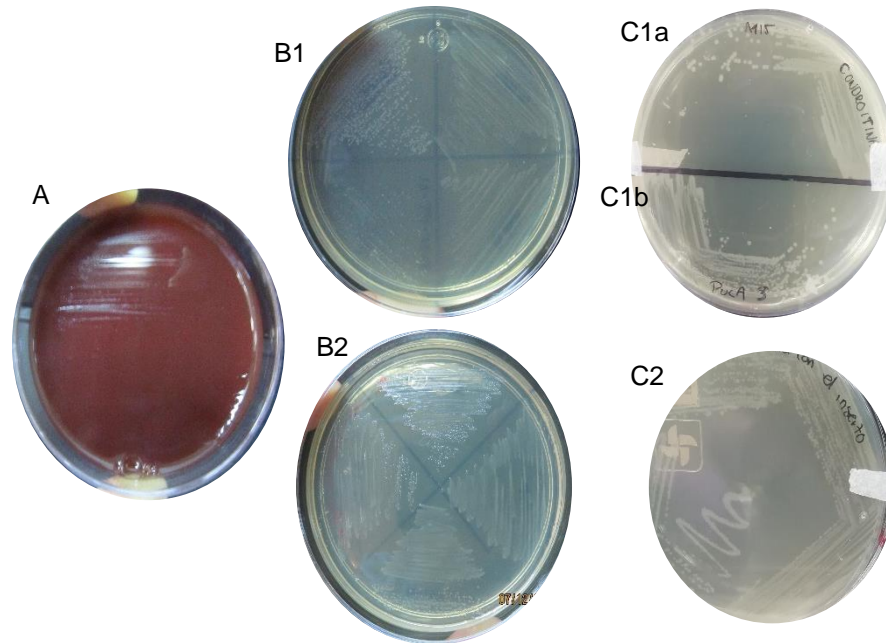


Figura 21.- Comparación fenotípica de *A. paragallinarum* y *E. coli* en medios de cultivo con y sin condroitín sulfato. A) *A. paragallinarum* en medio agar sangre adicionado con NAD⁺ y suero de caballo, con morfología en forma de gotas de rocío. B1) *A. paragallinarum* en medio BHI adicionado con NAD⁺, donde se observa un fenotipo en forma de gotas de rocío. B2) *A. paragallinarum* en medio BHI adicionado con NAD⁺ y sulfato de condroitina. C1a) *E. coli* M15 en medio LB, en donde se observa el crecimiento normal sobre un medio enriquecido y C1b) *E. coli* M15 con el plásmido pBluescript II KS (-) con el inserto del gen que codifica para la condroitín liasa I en medio LB adicionado con sulfato de condroitina. C2) *E. coli* M15 con el plásmido pBluescript II KS (-) con el inserto del fragmento amino terminal I.

Mapas de las construcciones de pQE30 con insertos de *chly* I y *chly* II.

Los mapas de las construcciones fueron realizados en el programa SnapGene® utilizando las secuencias del plásmido de expresión pQE30 y los fragmentos obtenidos de las clonaciones en pBluescript II KS (-). En la Figura 22 se muestran los mapas de las construcciones que portan los genes que codifican las condroitín liasa I y II en los sitios de reconocimiento para enzimas de restricción *Bam*HI y *Pst*I, en el mapa se muestran los elementos del vector de expresión pQE30.

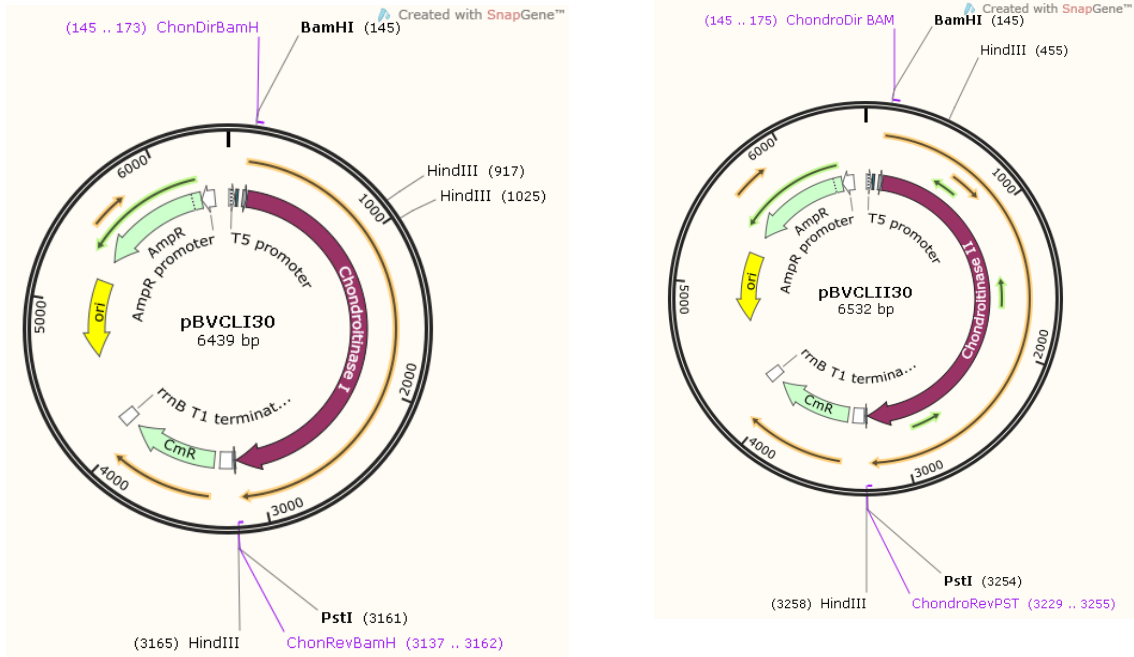


Figura 22.- Mapas físicos de las construcciones que contienen los genes *chly I* y *chly II* en pQE30. **pBVCLI30:** orf de *chlyI* en pQE30. **pBVCLII30:** orf de *chlyII* en pQE30. Las construcciones se hicieron considerando la inserción entre los sitios de restricción *BamHI* y *PstI*

Amplificación de fragmentos de genes *chly I* y *II* para la subclonación al vector de expresión pGLO

Por otro lado, se procedió con una estrategia de amplificación de los fragmentos de los genes que codifican para la condroitín liasa I y II con oligonucleótidos diseñados con secuencias de sitios reconocidos con enzimas de restricción *BamHI* y *PstI*. Estos se diseñaron para insertarlos en un plásmido de expresión que contiene una proteína verde fluorescente GFP, conocido como pGLO. Para esto se diseñaron oligonucleótidos para la apertura del plásmido de expresión. Se obtuvieron los amplificadores del plásmido linealizado y los fragmentos de la secuencia del gen que codifica para la *chly I* y *II*. Como se observa en la Figura 23.

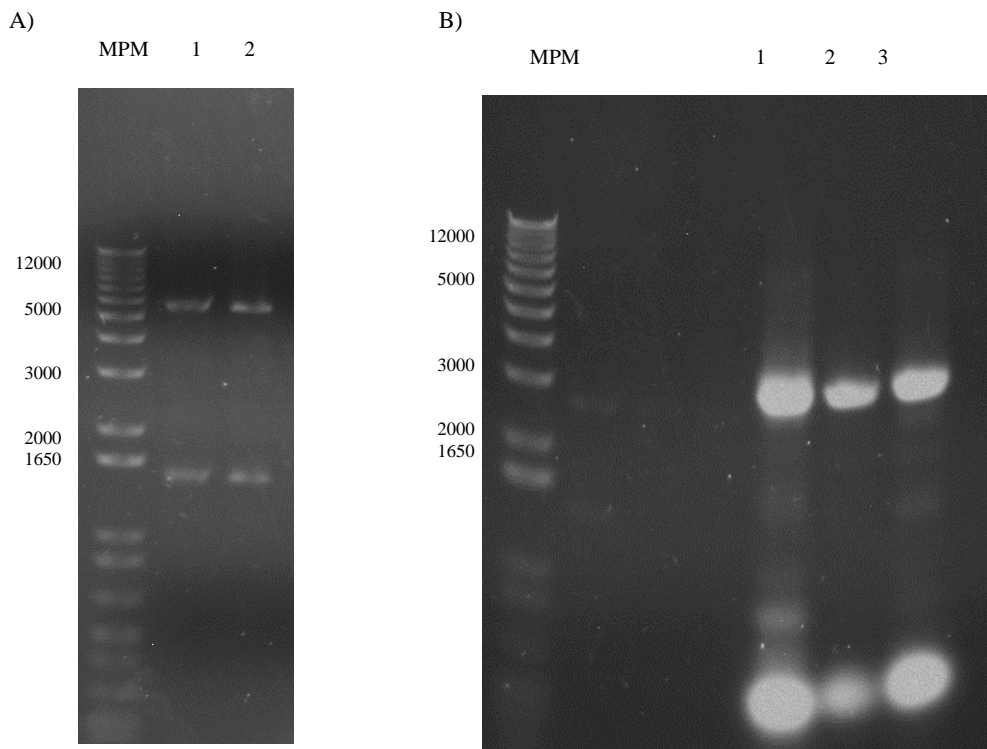


Figura 23.- Amplificación de los genes de *chly I* y *chly II* y del plásmido pGLO por PCR. Análisis por electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de productos de PCR punto final. Se usó como referencia de tamaño molecular el Marcador de peso molecular -1kb plus ladder Invitrogen™ (MPM). A) Amplificación de pGLO. 1 y 2: fragmento de 5300 nucleótidos del plásmido pGLO. B) Amplificación de fragmentos *chly I* y *chly II* por PCR. 1: Amplificación del fragmento del gen *chly I* con los sitios *BamHI* y *PstI* (3012 pb). 2 y 3: Amplificación del fragmento del gen *chly II* con *BamHI* y *PstI* (3105 pb).

DISCUSIÓN

Existen diferentes componentes en los microorganismos que les confieren la capacidad de causar enfermedades, conocidos como factores de virulencia, estos determinan la patogenicidad de las bacterias. Dichos factores de virulencia están involucrados directamente en la relación del huésped-patógeno en la colonización, adquisición de nutrientes, evasión e invasión, los cuales pueden ser enzimas, toxinas o moléculas de adhesión, entre otros (13). En AVPG se han reportado algunos componentes como factores de virulencia, por ejemplo, toxinas RTX, hemaglutinina, proteasas, vesículas de membrana externa, fimbrias y cápsula, entre otros (15, 20, 21, 24).

En diferentes bacterias se ha reportado que la cápsula proporciona protección contra la fagocitosis y la muerte mediada por el complemento (16), uno de los componentes de la cápsula son los GAG. Estos se clasifican en 4 polímeros dentro de los cuales se encuentran CS y DS que, a su vez, se encuentran presentes en tejidos de origen animal. Además, se han encontrado enzimas condroitín liasa capaces de degradar GAG como CS y DS del tejido animal, por lo que estas enzimas podrían ser consideradas factores de virulencia. Algunas de estas enzimas se han identificado en un amplio grupo de bacterias, por ejemplo *Arthrobacter aureus*, *Aureobacterium*, *Aeromonas liquefaciens*, *Bacteroides stercoris*, *Flavobacterium columnare* y *Flavobacterium heparinum*, *Vibrio sp*, *lavobacterium*, *Beneckea sp*, *Proteus sp*, *Micrococcus sp*, por lo que se ha considerado que muchas de estas enzimas están asociadas con la patogenicidad bacteriana (25, 27, 28, 30–35).

Por investigaciones genómicas en *A. paragallinarum* se han anotado genes relacionados con la producción de enzimas degradadoras de GAG, proponiéndose la existencia de dos *loci* que codifican para condroitín liasas (Cobos-Justo et al., 2019. Datos no publicados). El arreglo de estos *loci* asemejan a probables operones que deben caracterizarse, primero asegurando que producen enzimas activas y segundo conociendo la regulación genética de estas enzimas. Sin embargo, hasta el momento, en el laboratorio MIMOCE, no ha sido posible la manipulación genética de *A. paragallinarum* para generar mutantes por lo que se han propuesto trabajos de biología computacional para sugerir posibles vías de investigación y

estudios genéticos en sistemas heterólogos, usando a *E. coli* como modelo de expresión de genes de *A. paragallinarum*, con lo cual quizás se puedan confirmar las evidencias bioinformáticas o elucidar vías de regulación aún desconocidas. En el presente trabajo se hicieron estudios bioinformáticos puntuales de dos *loci* para conocer las estructuras genéticas que podrían abarcar parte u operones completos de condroitín liasas, *chly* I y *chly* II. La amplificación de los diferentes fragmentos corrobora la evidencia genómica descrita para los genes que codifican estas enzimas en la cepa 2015 de AVPG (11). La presencia de dos enzimas condroitín liasas ha sido reportada previamente en *P. vulgaris*, *F. heparinum* y *B. thetaiotaomicron*. En el caso del operón putativo I se observó la presencia de la caja -10 y -35 en las posiciones 1119 y 1096, respectivamente, además de los elementos de unión al DNA del tipo *fnr* ubicados en la posición 1075. En el caso de *fnr*, se trata de un activador transcripcional anaeróbico que controla la expresión de redes de genes en *E. coli*, pudiendo reclutar a la RNA polimerasa. (39, 40). Así mismo, se identificó la caja -10 en la posición 1567 y la caja -35 en la posición 1585 para el operón putativo II y un elemento de unión al DNA del tipo *ompR* en la posición 1559, el cual actúa como un regulador positivo interactuando con la región reguladora en *E. coli*. A partir de las secuencias regulatorias y en dirección río abajo se encontraron los genes que codifican la condroitín liasa.

Habiendo identificado los genes y los posibles operones donde están los genes de condroitín liasas se diseñaron oligonucleótidos para hacer las clonaciones como se esquematizó en la Figura 5. De esta forma se obtuvo una secuencia tipo operón para el operón I y dos secuencias con marcos de lectura abierta, teniendo las versiones con secuencias reguladoras para llevar a cabo la expresión heteróloga en *E. coli* y observar el fenotipo de cada uno de los genes por separado, y los marcos de lectura para hacer fusiones transcripcionales o traduccionales y hacer la expresión heteróloga.

La valoración fenotípica de las secuencias con genes completos de condroitín liasa de AVPG 2015 clonados en pBluescript II KS (-) y transformados en células competentes de *E. coli* mostró que no hay aparente actividad enzimática de Chly, aunque la valoración sólo se hizo con los genes separados y habría que evaluar sí el fenotipo es semejante o diferente cuando la *E. coli* contenga los dos genes *chly* I y II juntos. Es importante resaltar que únicamente

fueron probados en un vector de clonación y no se observaron en un vector de expresión con la presencia de promotores para su expresión. Un fenotipo asociado a condroitín liasa se observó cuando se sembró AVPG *cepa 2015* en medio BHI con NAD y en BHI con CS como control positivo. La esperanza de observar cambios fenotípicos por las enzimas en modelos heterólogos estaba basada en el caso de tener una regulación negativa en AVPG y quizás fuera constitutiva en *E. coli*. Aunque, Hamai (36) concluyó que la despolimerización completa de CS a disacáridos depende de las reacciones de combinación de endoeliminasa (ChS ABC liasa I) y exoeliminasa (ChS ABC liasa II) presentes en *P. vulgaris*. Por lo tanto, es probable que la presencia de distintas condroitín liasas ABC ofrezca a las bacterias la capacidad de procesar rápidamente sustratos de GAG. El procesamiento de condroitín liasa ABCI es importante ya que genera disacáridos que se pueden utilizar fácilmente para el metabolismo bacteriano (41). Si bien la evidencia apunta en este sentido en *A. paragallinarum*, la limitante que afecta el fenotipo de este microorganismo es su lento crecimiento.

Como metas del trabajo se planteó hacer interrupciones de los genes de condroitín liasas, con esto se pretendía inducir la expresión de tres tipos de péptidos de estas enzimas: la proteína completa, la región amino terminal y la región carboxilo terminal, para después generar anticuerpos por medio de estos péptidos purificados, pues no se sabe si las Chly son inmunogénicas y si la respuesta inmune responde contra estas proteínas en el caso de las infecciones de AVPG durante la coriza infecciosa. Considerando que se generarían fragmentos amino y carboxilo terminal de las enzimas Chly, también comparar la actividad enzimática in vivo de la versión completa de la enzima respecto a la porción amino terminal, esta última generada por la interrupción a través de un cassette de resistencia a kanamicina proveniente del plásmido pOV. Para cumplir con estas pretensiones en este trabajo se obtuvieron un total de 3 construcciones en pBluescript II KS (-) que contenían el fragmento del brazo amino terminal I, el fragmento del brazo carboxilo terminal I y el fragmento del brazo carboxilo terminal II. Estas construcciones servirán para uso futuro en la inducción y expresión de proteínas para verificar si estas interrupciones pueden generar una respuesta inmune.

Habiendo diseñado dos juegos de primers que se ubicaban en el 50% de los genes *chly I* y *chly II* para interrumpir los genes, se hizo la revisión bioinformática acerca de la estructura de las enzimas y el modelaje 3D del sitio activo en estas enzimas para contar con los indicios de la integridad de la proteína después de la manipulación de las secuencias durante la clonación, no obstante no hemos logrado aun expresar las enzimas en el modelo heterólogo en *E. coli*, es conveniente para proseguir en el futuro con el proyecto.

Las probables enzimas condroitín liasas podrían degradar el sulfato de dermatan, así como lo hacen con el sulfato de condroitina, ya que el análisis bioinformático de Choly I y Choly II sugiere que son del tipo ABC, y que su tamaño es congruente con el tamaño de otras condroitín liasas (1002 y 1011 aa). Comparado con lo reportado en NCBI, se han encontrado genes que codifican condroitín liasas con una longitud que va desde los 997 aa hasta los 1014 aa, en especies como *Proteus vulgaris*, *P. mirabilis*, *Vibrio sp*, *E. piscicida* y *E. tarda* (42). Por otro lado, la búsqueda de identidades de las enzimas Chly I y II en los registros de GenBank (GCA_000969315.2 y GCA_000969305.1) mostró que existen diferentes enzimas condroitín liasa que degradan CS y DS. Al mismo tiempo el análisis bioinformático de la estructura primaria de la proteína y de la estructura terciaria en I-TASSER arrojó que la Chly I tiene una identidad de secuencia de 0.31 y un TM-score del 0.915 lo cual nos indica la similitud entre la estructura generada y la estructura plantilla que corresponde a una proteína condroitín liasa ABC I de la bacteria *Bacteroides thetarotaomicron*. En el caso de la Chly II, esta presenta una identidad de secuencia de 0.31 y un TM-score del 0.939 en donde se muestra la similitud entre la estructura generada y la estructura plantilla que corresponde a una proteína condroitín ABC liasa de la bacteria *Proteus vulgaris*.

El sitio activo en la condroitín liasa se conforma por una tétrada catalítica Tyr-His-Arg-Glu altamente conservada, en *chly I* se encuentran en las posiciones Tyr472, His465, Arg525, Glu619, mientras que para *chly II* se encuentran en las posiciones Tyr512, His505, Arg564 y Glu 657. Esta tétrada catalítica se encuentra presente en las proteínas enzimas ChonAC c (37). La hendidura de unión al sustrato es amplia, similar a lo reportado por Shaya *et al.* (2008) en donde ambas proteínas tienen amplias hendiduras de unión al sustrato. Se ha

reportado que con la mutación de cualquier aminoácido de la tétada catalítica se pierde completamente la actividad de la enzima (44).

Respecto a la estrategia de generar proteínas fusionadas para purificarlas y hacer la inmunización de animales de experimentación como conejos o ratones, se obtuvieron objetivos parciales, que pueden ayudar en el futuro próximo para contar con los anticuerpos. Una vez que se obtuvieron las clonas en pBluescript II KS (-), fueron subclonadas en un vector de expresión pQE30. Esto facilita que *E. coli* tenga actividad en la transcripción del mensajero y, en última instancia, la expresión de la proteína, garantizando un alto grado de control de la misma. Al mismo tiempo se amplificaron los genes *chly* I y *chly* II diseñados para la ligación en un vector de expresión pGLO con una proteína GFP esta estrategia tiene como finalidad el seguimiento de la expresión de las proteínas ya que esta se acompaña de la expresión de la proteína verde fluorescente.

Por último, las perspectivas de este trabajo son la sobre-expresión de las proteínas condroitín liasa I y II, así como la utilización de la proteína para la inmunización de conejos y producción de anticuerpos. A su vez, se propone la expresión de las proteínas en el vector pGLO para el seguimiento de las proteínas con el acompañamiento de una proteína verde fluorescente.

CONCLUSIONES

- El análisis bioinformático muestra que la posible identidad de las condroitín liasas son tipo ABC.
- Se identificaron las cajas -10 y -35 en los operones putativos *chly I* y *chly II*, así como elementos de unión al DNA durante la transcripción.
- Se identificaron los aminoácidos de las tétradas cruciales del sitio activo que se encuentran altamente conservadas en enzimas Chly.
- Se obtuvieron 8 clonas en pBluescript II KS (-) y se obtuvo una clona de *chly I* y una clona *chly II* en el vector de expresión pQE30.
- En *E. coli* los genes *chly I* y *chly II* clonados por separado no generan cambio en el fenotipo colonial en presencia de sulfato de condroitina, por lo que sugiere la necesidad de un promotor diferente o una probable dependencia de los productos de los dos genes o una regulación especial desconocida aún.

PERSPECTIVAS

- Terminar la estrategia para la expresión de las proteínas de condroitín liasas y la expresión de la proteína verde fluorescente (GFP) nos permitirá generar anticuerpos y hacer un análisis funcional de las proteínas de la condroitín liasa, respectivamente.
-

BIBLIOGRAFÍA

1. Blackall P. 1999. Infectious Coryza: Overview of the Disease and New Diagnostic Options. *Clin Microbiol Rev* 12:627–632.
2. Cigoy ML, Huberman Y, Terzolo HR. 2016. Coriza infecciosa. *Avicultura*.
3. Soriano-Vargas E, Sánchez-Morales J, Morales-Erasto V, García-Sánchez A. 2013. Aislamiento e identificación de *Avibacterium paragallinarum* NAD independiente (serovariedad C-1) en gallinas de reemplazo con coriza infecciosa. *Vet Méx* 44:58–62.
4. Blackall PJ, Soriano-Vargas E. 2013. Infectious Coryza and Related Bacterial Infections, p. 859–873. In *Diseases of Poultry: Thirteenth Edition*. Wiley-Blackwell.
5. Soriano Vargas E, Terzolo HR. 2004. *Haemophilus paragallinarum*: Etiología de la coriza infecciosa *Haemophilus paragallinarum*: Etiology of infectious coryza. *Vet Méx* 35:245–259.
6. Christensen H, Kuhnert P, Norskov-Lauritsen N, Planet PJ, Bisgaard M. 2014. The Family Pasteurellaceae, p. 535–564. In *The Prokaryotes: Gammaproteobacteria*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
7. Blackall PJ, Christensen H, Beckenham T, Blackall LL, Bisgaard M. 2005. Reclassification of *Pasteurella gallinarum*, [*Haemophilus*] *paragallinarum*, *Pasteurella avium* and *Pasteurella volantium* as *Avibacterium gallinarum* gen. nov., comb. nov., *Avibacterium paragallinarum* comb. nov., *Avibacterium avium* comb. nov. and *Avibacterium* . *Int J Syst Evol Microbiol* 55:353–362.
8. Soriano E, Blackall PJ, Dabo SM, Téllez G, García-Delgado A, Fernández RP. 2001. Serotyping of *Haemophilus paragallinarum* Isolates from Mexico by the Kume Hemagglutinin Scheme. *Am Assoc Avian Pathol* 45:680–683.
9. Sakamoto R, Baba S, Ushijima T, Kino Y, Honda T, Mizokami H, Sakaguchi M. 2013. Development of a Recombinant Vaccine Against Infectious Coryza in Chickens. *Res Vet Sci* 94:504–509.
10. Matsumoto M, Yamamoto R. 1971. A Broth Bacterin Against infectious Coryza: Immunogenicity of Various Preparations. *Avian Dis* 15:109–117.
11. Horta-Valerdi G, Sanchez-Alonso MP, Perez-Marquez VM, Negrete-Abascal E, Vaca-Pacheco S, Hernandez-Gonzalez I, Gomez-Lunar Z, Olmedo-álvarez G, Vázquez-Cruza C. 2017. The Genome Sequence of *Avibacterium paragallinarum*

- strain CL has a Large Repertoire of Insertion Sequence Elements. *Genome Announc* 5:1–2.
12. Guerrero-González Z. 2018. Anotación del Genoma De *Avibacterium paragallinarum* Cepa 5. Tesis de Maestría, BUAP.
 13. Persson G, Bojesen AM. 2015. Bacterial Determinants of Importance in the Virulence of *Gallibacterium anatis* in Poultry. *Vet Res* 46:1–11.
 14. Allan ND, Kooi C, Sokol PA, Beveridge TJ. 2003. Putative Virulence Factors are Released in Association with Membrane Vesicles from *Burkholderia cepacia*. *Can J Microbiol* 49:613–624.
 15. Pan Y-C, Tan D-H, Shien J-H, Liu C-C, He Y-S, Shen P-C, Chang P-C. 2012. Identification and Characterization of an RTX Toxin-Like Gene and Its Operon from *Avibacterium paragallinarum*. *Avian Dis* 56:537–544.
 16. Wu JR, Chen PY, Shien JH, Shyu CL, Shieh HK, Chang F, Chang PC. 2010. Analysis of the Biosynthesis Genes and Chemical Components of the Capsule of *Avibacterium paragallinarum*. *Vet Microbiol* 145:90–99.
 17. Frey J. 2011. The role of RTX Toxins in Host Specificity of Animal Pathogenic Pasteurellaceae. *Vet Microbiol* 153:51–58.
 18. Frey J, Kuhnert P. 2002. Mini-Review RTX Toxins in Pasteurellaceae. *Int J Med Microbiol* 292:149–158.
 19. Takagi M, Hirayama N, Simazaki T, Taguchi K, Yamaoka R, Ohta S. 1993. Purification of Hemagglutinin from *Haemophilus paragallinarum* Using Monoclonal Antibody. *Vet Microbiol* 34:191–19.
 20. Wang YP, Hsieh MK, Tan DH, Shien JH, Ou SC, Chen CF, Chang PC. 2014. The Haemagglutinin of *Avibacterium paragallinarum* is a Trimeric Autotransporter Adhesin that Confers Haemagglutination, Cell Adherence and Biofilm Formation Activities. *Vet Microbiol* 174:474–482.
 21. Rivero-García P., Vázquez Cruz C, Sánchez Alonso P, Vaca S, E. N-A. 2005. *Haemophilus paragallinarum* Secretes Metalloproteases. *Can J Microbiol* 51:893–896.
 22. Kadurugamuwa JL, Beveridge TJ. 1995. Virulence Factors Are Released from *Pseudomonas aeruginosa* in Association with Membrane Vesicles during Normal

- Growth and Exposure to Gentamicin: a Novel Mechanism of Enzyme Secretion. *J Bacteriol* 177:3998–4008.
23. Ramón Rocha MO, García-González O, Pérez-Méndez A, Ibarra-Caballero J, Pérez-Márquez VM, Vaca S, Negrete-Abascal E. 2006. Membrane Vesicles Released by *Avibacterium paragallinarum* Contain Putative Virulence Factors. *FEMS Microbiol Lett* 257:63–68.
 24. Liu C-C, Ou S-C, Tan D-H, Hsieh M-K, Shien J-H, Chang P-C. 2016. The Fimbrial Protein is a Virulence Factor and Potential Vaccine Antigen of *Avibacterium paragallinarum* . *Avian Dis* 60:649–655.
 25. Hernáiz MJ, Linhardt RJ. 2001. Degradation of Chondroitin Sulfate and Dermatan Sulfate with Chondroitin Lyases, p. 363–370. In Lozzo, R. (ed.), *Methods in Molecular Biology*. Humana Press Inc.
 26. Fang Y, Yang S, Fu X, Xie W, Li L, Liu Z, Mou H, Zhu C. 2019. Expression, Purification and Characterization of Chondroitinase AC II from *Marine Bacterium*. *Mar Drugs* 17:10.
 27. Kitamikado M, Lee Y. 1975. Chondroitinase-Producing Bacteria in Natural Habitats. *Appl Microbiol Mar* 29:414–421.
 28. Jandik KA, Gu K, Linhardt RJ. 1994. Action Pattern of Polysaccharide Lyases on Glycosaminoglycans Kenneth. *Glycobiology* 4:289–296.
 29. Petit E, Delattre C, Garcia DP, Michaud P. 2006. Chondroitin Sulfate Lyases : Applications in Analysis and Glycobiology, p. 167–185. In *Advances in Pharmacology*.
 30. Gu K, Linhardt RJ, Gut K, Zimmermann J, Medicinal D, Chemistry NP, Pharmacy C, City I. 1995. Purification , Characterization and Specificity of Chondroitin Glycuronidase from *Flavobacterium heparinum*. *Biochem J* 577:569–577.
 31. Hong S, Kim B, Shin H, Kim W, Lee K, Kim Y, Kim D. 2002. Purification and Characterization of Novel Chondroitin ABC and AC Lyases From *Bacteroides stercoris* HJ-15 , a Human Intestinal Anaerobic Bacterium. *Biochem J* 294:2934–2940.
 32. Linn S, Chan T, Lipeski L, Salyers AA. 1983. Isolation and Characterization of Two Chondroitin Lyases from *Bacteroides thetaiotaomicron*. *J Bacteriol* 156:859–866.

33. Williams A, He W, Cress BF, Liu X, Alexandria J, Yoshizawa H, Nishimura K, Toida T, Koffas M, Linhardt RJ. 2017. Cloning and Expression of Recombinant Chondroitinase ACII and Its Comparison to the *Arthrobacter aurescens* Enzyme. *Biotechnol J* 12:1–20.
34. Zhu C, Zhang J, Zhang J, Jiang Y, Shen Z, Guan H, Jiang X. 2016. Purification and Characterization of Chondroitinase ABC from *Acinetobacter sp.* C26. *Int J Biol Macromol* <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.10.044>.
35. Abdul-Gani, Murtadha Nabeel Laftaah BA. 2017. Purification and Characterization of Chondroitinase ABC from *Proteus vulgaris*, an Iraqi Clinically Isolate. *Curr Sci* 113:2134–2140.
36. Hamai A, Hashimoto N, Mochizuki H, Kato F, Makiguchi Y, Horie K, Suzuki S. 1997. Two Distinct Chondroitin Sulfate ABC Lyases. *J Biol Chem* 272:9123–9130.
37. Shaya D, Hahn BS, Bjerkan TM, Kim WS, Park NY, Sim JS, Kim YS, Cygler M. 2008. Composite Active Site of Chondroitin Lyase ABC Accepting Both Epimers of Uronic Acid. *Glycobiology* 18:270–277.
38. Dombroski AJ, Walter WA, Record MT, Siegele DA, Gross CA. 1992. Polypeptides Containing Highly Conserved Regions of Transcription Initiation Factor 070 Exhibit Specificity of Binding to Promoter DNA. *Cell* 70:501–512.
39. Katsir G, Jarvis M, Phillips M, Ma Z, Gunsalus RP. 2015. The *Escherichia coli* NarL Receiver Domain Regulates Transcription Through Promoter Specific Functions. *BMC Microbiol* 15:1–13.
40. Barnard AML, Green J, Busby SJW. 2003. Transcription Regulation by Tandem-Bound FNR at *Escherichia coli* Promoters. *J Bacteriol* 185:5993–6004.
41. Prabhakar V, Capila I, Bosques CJ, Pojasek K, Sasisekharan R. 2005. Chondroitinase ABC I from *Proteus vulgaris*: Cloning, Recombinant Expression And Active Site Identification. *Biochem J* 386:103–112.
42. Sayers EW, Beck J, Brister JR, Bolton EE, Canese K, Comeau DC, Funk K, Ketter A, Kim S, Kimchi A, Kitts PA, Kuznetsov A, Lathrop S, Lu Z, McGarvey K, Madden TL, Murphy TD, O’Leary N, Phan L, Schneider VA, Thibaud-Nissen F, Trawick BW, Pruitt KD, Ostell J. 2020. Database Resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res* 48:D9–D16.

43. Huang W, Boju L, Tkalec L, Su H, Yang H, Gunay NS, Linhardt RJ, Kim YS, Matte OA, Cygler M. 2001. Active Site of Chondroitin AC Lyase Revealed by the Structure of Enzyme - Oligosaccharide Complexes and Mutagenesis †,‡. *Biochemistry* 40:2359–2372.
44. Prabhakar V, Capila I, Soundararajan V, Raman R, Sasisekharan R. 2009. Recombinant Expression , Purification , and Biochemical Characterization of Chondroitinase ABC II from. *J Biol Chem* 284:974–982.

ANEXOS

Extracción de DNA genómico

Avibacterium paragallinarum se sembró en una placa agar gelosa sangre, con una estría de *Staphilococcus aureus*, incubados durante 18 horas a 37°C, posteriormente se tomó una colonia y se sembró en 50 ml de medio BHI (Brain Heart Infussion) con agitación constante a 200 rpm durante 18 horas a 37°C. El cultivo se centrifugo en 2 tubos eppendorf de 1.5 ml y se centrifugó a 11000 rpm durante 30 segundos, se descartó el sobrenadante hasta que se terminó el cultivo. Se re-suspendió la pastilla en 500 µl de Buffer de lisis y se adicione una pizca de lisozima, se incubaron por 10 minutos a 37°C, posteriormente se homogeneizaron manualmente. Se agregó un volumen de Fenol-Tris pH 8, se agitaron en vórtex, posteriormente se centrifugaron los tubos a 11000 rpm durante 10 minutos, una vez terminado a fase acuosa fue transferida a tubos limpios a los cuales se les agrego 1 volumen de Fenol-Cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), se agito manualmente y nuevamente se centrifugo a 11000 rpm por 10 min., la fase acuosa se transfirió a tubos nuevos, se agregó un volumen de Cloroformo para retirar el exceso de fenol, se agito manualmente y se centrifugo a 11000 rpm durante 10 min, nuevamente la fase acuosa fue transferida a un nuevo tubo y se agregó un volumen de Alcohol absoluto frio y medio volumen de acetato de amonio 3M pH 7, el cual se homogeneizo manualmente y se dejó precipitar por dos horas a -20°C. Posteriormente se centrifugó a 11000 rpm durante 10 min, se desechó el sobrenadante y se lavó la pastilla con etanol al 70%, se dejó secar la pastilla a temperatura ambiente. Por último, la pastilla se re-suspendió con 100 µl de agua PiSA® estéril y se almacenó a -20°C.

Posteriormente el DNA genómico fue tratado con 10 µl de RNase se incubo a 37°C durante 3 horas y se les agrego 1 volumen de Fenol-Cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), se agito manualmente y nuevamente se centrifugo a 11000 rpm por 10 min., la fase acuosa se transfirió a tubos nuevos, se agregó un volumen de Cloroformo para retirar el exceso de fenol, se agito manualmente y se centrifugo a 11000 rpm durante 10 min, nuevamente la fase acuosa fue transferida a un nuevo tubo y se agregó un volumen de Alcohol absoluto frio y medio volumen de acetato de amonio 3M pH 7, el cual se homogeneizo manualmente y se dejó precipitar por dos horas a -20°C. Posteriormente se centrifugó a 11000 rpm durante 10 min, se desechó el sobrenadante y se lavó la pastilla con etanol al 70%, se dejó secar la pastilla a

temperatura ambiente. Por último, la pastilla se re-suspendió con 100 µl de agua PiSA® estéril y se almacenó a -20°C.

Extracción de DNA plasmídico

El plásmido de clonación pBluescript II KS (-) (Stratagene®) y el vector de expresión pQE (Quiagen®) se obtuvieron a partir de colonias de *E. coli* que contenían los respectivos plásmidos de clonación y expresión, sembrada en medio LB (Luria Bertani) adicionado con ampicilina (5 g de peptona de caseína, 5 g de NaCl, 2.5 g de extracto de levadura, 4 g de agar agar y 100 µl/ml de ampicilina). Posteriormente se inoculó una colonia aislada en 50 ml de medio LB adicionado con ampicilina (5 g de peptona de caseína, 5 g de NaCl, 2.5 g de extracto de levadura y 100 µl/ml de ampicilina) se incubaron a 37°C con agitación constante a 200 rpm durante 18 h. Pasado el tiempo de incubación se centrifugó a 3500 rpm durante 15 min, se decantó el sobrenadante y se agregó 3 ml de solución Birnboim I (Glucosa 50 mM, Tris HCL 25 Mm y EDTA 10 mM pH 8), se re-suspendió la pastilla en un vórtex y se agregaron 6 ml de solución Birnboim II (NaOH 0.2 N y SDS al 1%) y se mezcló por agitación manual. Por último, se agregó 4 ml de solución Birnboim III (Acetato de potasio 5 M y ácido acético glacial 10%) se mezcló y se centrifugó a 15 min a 3500 rpm. El sobrenadante se transfirió a tubo falcón con ayuda de una gasa estéril mediante filtración, se agregaron 6 volúmenes de isopropanol y se dejó a -20°C durante 2 h. Pasado el tiempo se centrifugó durante 15 min a 3500 rpm, se desechó el sobrenadante, se secó la pastilla y posteriormente se re-suspendió la pastilla con 200µl de agua inyectable PiSA®. Se analizó la extracción de DNA plasmídico en una electroforesis en un gel de agarosa al 0.8%. Por último, se trataron con RNAsa y se purificaron por fenolización.

Digestión de pBluescript II KS (-)

Se realizó una digestión con la enzima de restricción EcoRV (Fermentas®), en un tubo eppendorf de 1.5 ml se agregaron 3 µl de buffer 10X (10 mM Tris-HCL pH 8.5, 10 mM MgCl₂, 100 mM KCL y 0.1 mg/ml BSA), 1 µg de DNA plasmídico, 2 µl de enzima EcoRV, y se aforo ca 30 µl de agua inyectable PiSA®, se homogeneizo mezclando suavemente y se incubó a 37°C por 3 h. La digestión se analizó mediante electroforesis en un gel de agarosa

0.8%, a 100V por 45 min. El gel de agarosa se tiñó con Bromuro de etidio y se visualizó mediante un transiluminador UV (UVP®).

Amplificación por PCR

En un tubo para PCR, estéril de 200 µl se agregaron 17 µl de Agua inyectable PiSA® estéril, 2.5 µl de buffer 10X para Taq DNA Polimerasa o *Pfx*, 1 µl MgCl₂ (50 mM) o MgSO₄ (50 mM), 1 µl de mix de dNTP (10 mM), 1 µl de oligonucleótidos (directo y reverse) (10 µM), DNA genómico de AVPG (100 ng) y enzima Taq DNA polimerasa (0.5 µl) o *Pfx* (0.2 µl), se mezcló suavemente y se colocaron en el termociclador (Biorad® T100), con el siguiente ciclo de amplificación: 1 ciclo a 95°C por 1 min, 28 ciclos a 94°C por 30 segundos (desnaturalización). En el caso del alineamiento la T_M dependió de acuerdo a cada amplificado (pBVOCCI: 49°C, pBVOCPCI: 49° C, pBVOCI: 57° C, pBVIACI: 52.4°C, pBVIBCI: 54.4°C , pBVACII: 55.65° C, pBVOPCII: 55°C, pBVOCII: 55°C, pBVIACII: 54°C, pBVIBCII: 55°C) con un tiempo de variación de 2:30 min, y la extensión con un tiempo de 2:30 a 72°C, por último, con un ciclo de 72°C por 2:30 min. Los productos de PCR amplificados se analizaron en una electroforesis (cámara de electroforesis Biorad®), en un gel de agarosa al 0.8% a 100V por 45 min. El gel de agarosa se tiñó con Bromuro de etidio y se visualizó mediante un transiluminador UV (UVP®).

Ligación de fragmentos de PCR con vectores de clonación

Los productos amplificados por PCR con enzima DNA polimerasa *Pfx* (Invitrogene ®) se ligaron al vector digerido pBluescript II KS (-), la reacción consistió en 3 µl de buffer T4 ligasa (400 mM Tris-HCL, 100 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 5 Mm ATP pH 7.8), 1 µl de enzima T4-DNA ligasa (5 U/ µl), 100 ng de inserto y 300 ng de plásmido digerido, con una proporción vector: inserto de 1:3. La ligación se dejó a temperatura ambiente durante 18 h.

Células competentes de *E. coli* por Cloruro de Sodio

Se tomó una colonia aislada de un cultivo fresco y se inoculó en 3 ml de medio LB (5 g de peptona de caseína, 5 g de NaCl y 2.5 g de extracto de levadura), se incubó a 37°C con agitación constante a 200 rpm durante 18 h, el pre-cultivo se usó para inocular un matraz de 250 ml de medio Lb (5 g de peptona de caseína, 5 g de NaCl y 2.5 g de extracto de levadura),

se tomó 3 ml de pre-cultivo e incubaron a 37°C con agitación constante 200 rpm, hasta alcanzar una $D_{600} = 0.6$ (Aproximadamente 3 horas de incubación). Posteriormente se centrifugaron a 4°C a 400 rpm durante 10 min, se desechó el sobrenadante y la pastilla se re-suspendió en una solución I (CaCl_2 0.1M), se dejó reposar en hielo por 15 min y se centrifugó a 3500 rpm a 4°C durante 10 min., se desechó el sobrenadante y se agregaron 2 ml de solución reguladora II (CaCl_2 0.1 M, 15% de Glicerol pH 7). Se re-suspendió la pastilla y se dispuso en alícuotas de 200 μl en tubos eppendorf de 1.5 ml, se almacenaron a -70°C.

Transformación bacteriana por choque térmico

Se tomó un vial de células competentes y se dejaron descongelar por 5 min en hielo, posteriormente se agregaron 3 μl de producto de ligación (plásmido pBluescript II Ks (-) digerido con EcoRV y producto de PCR amplificado con enzima *Pfx*, se dejó en hielo por 30 min, posteriormente se sometieron las células a choque térmico de 10 min a 37°C, se agregó 1 ml de medio LB y se incubaron a 37°C por 1 h. Por último, se agregaron 100 μl en una placa de LB con ampicilina (100 ng/ μl), 40 μl de X-Gal (5 – Bromo-4 Cl-3 indolyl- β -D-galactosidasa) 20 mg/ml y 4 μl de IPTG (isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido) 1M y se incubaron a 37°C durante 16 h.

Selección de clonas recombinantes

Las células transformadas se seleccionaron en medio LB con ampicilina ((100 ng/ μl), 40 μl de X-Gal (5 – Bromo-4 Cl-3 indolyl- β -D-galactosidasa) 20 mg/ml y 4 μl de IPTG (isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido) 1M, durante 18 h a 37°C. fueron seleccionadas aquellas que no fueron capaces de llevar a cabo la α - complementación de la β -galactosidasa, es decir colonias blancas, las cuales no son capaces de producir la enzima β -galactosidasa debido a que la región que sintetiza a la enzima se parte para dar paso a la secuencia recombinante y se interrumpe el gen *lacZ*, por lo tanto, el operón se vuelve incapaz de sintetizar la enzima β -galactosidasa funcional. Estas colonias fueron sembradas en una nueva placa de LB con ampicilina (100 ng/ μl), 40 μl de X-Gal (5 – Bromo-4 Cl-3 indolyl- β -D-galactosidasa) 20 mg/ml y 4 μl de IPTG (isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido) 1M, para corroborar el fenotipo de las colonias seleccionadas, al mismo tiempo las colonias seleccionadas se

inocularon en 3 ml de LB con ampicilina (100 ng/ μ l), incubadas a 37°C durante 18 h, posteriormente se extrajo DNA plasmídico de las posibles colonias transformantes.

Para corroborar la presencia del inserto en las clonas transformantes, se realizaron digestiones con enzimas de restricción como *EcoRI* para la linealización del plásmido, se analizó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, el cual se corrió durante 45 min a 100 V en una cámara de electroforesis (Biorad®). El gel de agarosa se tiñó con Bromuro de etidio y se visualizó mediante un transiluminador UV (UVP®).

Preparación de medio para la comparación fenotípica

Para comparar las clonas resultantes en el vector pBluescript II ks (-), se sembraron en medio LB con ampicilina ((100 ng/ μ l), 40 μ l de X-Gal (5 – Bromo-4 Cl-3 indolyl- β -D-galactosidasa) 20 mg/ml y 4 μ l de IPTG (isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido) 1M, al cual se le agrego Sulfato de Codroitina (Condrosulf®) con una concentración de 1mg/ml, se incubaron por 18 h a 37°C.

Digestión de construcciones en pBluescript II KS (-)

Para liberar los productos clonados en el vector pBluescript II KS (-), se extrajo DNA plasmídico de las cepas transformantes de *E. coli* DH5 α que contenían el producto de interés, posteriormente se realizaron digestiones dobles que contenían el producto de interés, colocando en un tubo eppendorf estéril de 1.5 ml, 15 μ l de buffer 10X (*HindIII* buffer 10 mM Tris-HCl (PH 8.5), 10 Mm KCl, 0.1 mg/ml BSA., BamHI buffer 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 5mM MgCl₂, 100 mM KCl, 0.02% Triton X-100, 0.1 mg/ml BSA), 1 μ g de DNA plasmídico y agua inyectable PiSA® estéril, con un volumen final de 30 μ l, se agregó 1 V de enzima *BamHI*, *PstI*, o *HindIII*, según corresponda, se homogeneizó y se incubó a 37°C durante 3 h, al terminar la primera digestión se precipito el DNA con etanol absoluto y acetato de amonio a -20°C durante 2 h, posteriormente se centrifugó por 10 min a 11000 rmp y se lavó con etanol al 70%, se dejó secar la pastilla y se re-suspendió con 30 μ l de agua PiSA® estéril, se repitieron las condiciones de digestión. La digestión se verifico mediante una electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, el cual se corrió durante 45 min a 100 V en una cámara de electroforesis (Biorad®). El gel de agarosa se tiñó con Bromuro de etidio y se visualizó mediante un transiluminador UV (UVP®).

Digestión del vector de expresión pQE30

La digestión del vector de clonación se realizó con una mezcla de dos enzimas de restricción BamHI y *pst*I (Fermentas®). Se colocaron en un tubo eppendorf de 1.5 ml estéril, 3 µl de buffer 10X (*Bam*HI buffer 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 5mM MgCl₂, 100 mM KCl, 0.02% Triton X-100, 0.1 mg/ml BSA) 1 µg de DNA plasmídico y agua inyectable PiSA®, 2 µl de enzimas (*Bam*HI y *Pst*I), se homogeneizó y se incubó a 37°C por 3 h. La digestión se verificó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, el cual se corrió durante 45 min a 100 V en una cámara de electroforesis (Biorad®). El gel de agarosa se tiñó con Bromuro de etidio y se visualizó mediante un transiluminador UV (UVP®).

Ligación de productos digeridos al vector de expresión pQE30

El DNA liberado y purificado por fenolización a partir del vector de clonación pBluescript II KS (-) con las enzimas BamHI y *Pst*I, se ligó al vector de expresión pQE30 previamente digerido con las mismas condiciones de enzimas de restricción, la reacción consistió en 3 µl de buffer T4 ligasa (400 mM Tris-HCL, 100 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 5 Mm ATP pH 7.8), 1 µl de enzima T4-DNA ligasa (5 U/ µl), 100 ng de inserto y 300 ng de plásmido digerido, con una proporción vector: inserto de 1:3. La ligación se dejó a temperatura ambiente durante 18 h.

Transformación bacteriana por choque térmico

Se tomó un vial de células competentes y se dejaron descongelar por 5 min en hielo, posteriormente se agregaron 3 µl de producto de ligación (plásmido pQE30 digerido con BamHI y producto liberado del vector pBluescript II ks (-), se dejó en hielo por 30 min, posteriormente se sometieron las células a choque térmico de 10 min a 37°C, se agregó 1 ml de medio LB y se incubaron a 37°C por 1 h. Para corroborar la transformación se extrajo DNA plasmídico y se realizó una amplificación de los fragmentos por PCR.

Amplificación por PCR de fragmentos para ligación en pGLO

En un tubo para PCR, estéril de 200 µl se agregaron 17 µl de Agua inyectable PiSA® estéril, 2.5 µl de buffer 10X para Taq DNA Polimerasa o *Pfx*, 1 µl MgCl₂ (50 mM) o MgSO₄ (50

mM), 1 μ l de mix de dNTP(10 mM), 1 μ l de oligonucleótidos (directo y reverse) (10 μ M), DNA genómico de AVPG (100 ng) y enzima Taq DNA polimerasa (0.5 μ l) o Pfx (0.2 μ l), se mezcló suavemente y se colocaron en el termociclador (Biorad® T100), con el siguiente ciclo de amplificación: 1 ciclo a 95°C por 1 min, 28 ciclos a 94°C por 30 segundos (desnaturalización). En el caso del alineamiento la TM fue de 60° C, con un tiempo de variación de 2:00 min, y la extensión con un tiempo de 2:30 a 72°C, por último, con un ciclo de 72°C por 2:30 min. Los productos de PCR amplificados se analizaron en una electroforesis (cámara de electroforesis Biorad®), en un gel de agarosa al 0.8% a 100V por 45 min. El gel de agarosa se tiñó con Bromuro de etidio y se visualizó mediante un transiluminador UV (UVP®).