



03088

UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO

1  
207

---

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

Diseño y construcción de nuevos  
Vectores para la integración de  
DNA en el Cromosoma de  
*Escherichia coli*.

TESIS

Que para obtener el título de:

DOCTOR EN BIOTECNOLOGIA

Presenta:

M. en C. Paulina Balbás Diez Barroso

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Cuernavaca, Morelos

1996

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

RESUMEN DE LA TESIS QUE PRESENTA M.en C. PAULINA BALBAS DIEZ BARROSO PARA LA OBTENCION DEL TITULO DE DOCTOR EN BIOTECNOLOGIA, UNAM, FEBRERO 1996.

El presente trabajo se inició como respuesta a la necesidad de eliminar los problemas inherentes a la presencia de plásmidos multicopia del citoplasma de la bacteria *Escherichia coli*, mediante la integración en el cromosoma de la información genética clonada en vectores moleculares.

El sistema de integración seleccionado se basó en el efecto de recombinación homóloga doble de DNA en un sitio conocido del cromosoma bacteriano. El sistema consta de un vector molecular que contiene dos genes de resistencia a antibióticos, uno como marcador del vector y el otro como marcador de selección. Además un origen de replicación derivado del pBR322, y dos fragmentos del gene que codifica para la enzima beta-galactosidasa de *E. coli*, que es el gene donde se lleva a cabo la integración. Se requiere de una cepa específica ATCC47002, y las condiciones de cultivo no tienen requerimientos especiales.

Se construyó un sistema prototipo, y posteriormente tres derivados mejorados. Se midió la eficiencia de los mismos y se probó que el esquema propuesto funcionara del modo esperado. Los vectores se utilizaron solos y con genes clonados, y la integración de los DNAs fue exitosa en todos los casos probados con genes naturales. El DNA de interés integrado en la cepa del ATCC47002, pudo ser movilizado a otras cepas mediante transducción mediada por el bacteriófago P1, lo que hace de a sistema muy útil para la construcción o modificación de cepas específicas.

Se utilizó un gene sintético que codifica para un polímero tipo seda como un modelo para estudiar la eficiencia del sistema en casos de genes no naturales de secuencia compleja. Este gene presenta problemas serios de inestabilidad dado la naturaleza repetitiva de su secuencia nucleotídica. Este gene sí pudo ser integrado en ATCC47002, pero no pudo ser transferido a la cepa de producción debido a problemas de inestabilidad inherentes al gene mismo.

En el presente trabajo se discutieron las ventajas del sistema con respecto a otros, las posibles causas de la imposibilidad de transducir el gene sintético, y algunas de las posibles mejoras del sistema.

La información presentada en este trabajo fue utilizada para la publicación de dos artículos en revistas internacionales.

Vo.Bo. ASESOR

Dr. Fernando Valle.

SUMMARY OF THE THESIS PRESENTED BY M.en C. PAULINA BALBAS DIEZ BARROSO TO OBTAIN THE GRADE OF DOCTOR IN BIOTECHONOLOGY, UNAM, FEBRUARY, 1996.

This work started as an approach designed to overcome the limitations inherent to the use of multicopy plasmids in the bacterium *Escherichia coli*. Introduction of DNA fragments into the chromosome by homologous recombination was chosen as a strategy.

We described a general cloning system with attributes such as, site-directed gene insertion at the locus coding for beta-galactosidase; a molecular cloning vector with two antibiotic resistance genes to be used, one as a vector marker and the other as a selective scheme for integations, and the origin of replication of plasmid pBR322. Two gene fragments from the beta-galactosidase coding gene for site-directed integration of DNA were also included in the vector. The strain ATCC47002 is required, but no special growth and culture conditions.

A prototype system was built, and after this, three derivatives with enhanced characteristics. The efficiency of the system was measured in all four vectors, and they were used as wild types and with cloned genes from different origins. When natural genes were used, the system worked as expected. The integrated DNA from ATCC47002, was successfully mobilized into other strains using specialized transduction via bacteriophage P1, which makes this system very useful for strain modification and construction.

A synthetic gene was also utilized to test the efficiency using non-natural complex genes. This gene encodes a protien polymer, and it has proven to be highly unstable due to the repetitive nature of its nucleotide sequence. This gene was successfully integrated into the ATCC47002 chromosome, but could not be transferred to a producing strain because of a serious instability problem.

In this thesis, the advantages ad disadvantages of the system were discussed when compared to other analogous systems. The possible causes of the inability of the system to transduce the synthetic gene, and some improvements to the system were also discussed.

This information was compiled into two papers that were published in international scientific journals.

Vo.Bo. ASESOR

  
Dr. Fernando Valle Baheza

## INDICE DE MATERIAS

### CAPITULO 1 INTRODUCCION

Antecedentes y Justificación.....	1
Objetivo .....	5
Generalidades .....	5

### CAPITULO 2 CONSTRUCCION DEL SISTEMA PROTOTIPO PARA LA INTEGRACIÓN POR RECOMBINACION HOMOLOGA DOBLE PARA *Escherichia coli*.

Resúmen, Introducción y Experimentos y Discusión.....	12
Reconocimientos .....	13
Referencias .....	14

### CAPITULO 3 CONSTRUCCION DE NUEVOS VECTORES DE INTEGRACION CROMOSOMAL BASADOS EN EL SISTEMA PROTOTIPO.

Portada.....	16
Summary and Introduction.....	17
Experimental and Discusion.....	18
References .....	20
Acknowledgements.....	22
Figures .....	23

### CAPITULO 4 INTEGRACION CROMOSOMAL DEL GENE QUE CODIFICA PARA UNA SEDA SINTETICA EN *Escherichia coli*.

Introducción .....	27
Objetivo .....	29
Generalidades .....	29
Resultados y Discusión .....	33
Conclusiones .....	40

### CAPITULO 5 DISCUSION GENERAL

Discusión .....	41
-----------------	----

REFERENCIAS .....	46
-------------------	----

ANTECEDENTES y JUSTIFICACION

OBJETIVO

GENERALIDADES

## ANTECEDENTES Y JUSTIFICACION

La Historia ha demostrado que los avances significativos en actividades científicas son siempre resultado del diseño y utilización de herramientas y métodos novedosos. El Comité de los Premios Nobel ha reconocido desde hace años los esfuerzos en el desarrollo de técnicas y herramientas, precisamente porque éstas poseen un enorme poder de transformación sobre algún campo de la investigación que influye directamente sobre varios aspectos de la Ciencia. Los métodos y las herramientas en sí, están generalmente sujetos a evolución y mejoramiento permanentemente, por lo que su refinamiento también se vuelve un aspecto importante del quehacer científico y tecnológico. A su vez, estos intentos de mejoramiento revelan muchas veces, nuevos fenómenos que demandan el planteamiento de hipótesis que enriquecen al campo mismo del conocimiento. Por esto, queda claro que la evolución conjunta del avance científico y el desarrollo de técnicas y herramientas potencian indudablemente el progreso de las Ciencias.

Este aspecto ha sido particularmente desarrollado en nuestro laboratorio durante los últimos 15 años, concomitantemente a dos grandes líneas de investigación: el estudio de la regulación de genes y de vías metabólicas, y la producción de proteínas heterólogas en la bacteria *Escherichia coli*. El reconocimiento internacional de nuestro grupo en el área del desarrollo metodológico estriba en la construcción, caracterización, utilización y análisis teórico de plásmidos multicopia basados en el plásmido pBR322 como vectores para *E. coli* (Bolívar et al., 1977a, 1977b; Bolívar, 1978; Soberón et al., 1980; Covarrubias et al., 1980; 1981; Zurita et al., 1982; Balbás et al., 1986; Balbás et al., 1988).

El término plásmido fue originalmente acuñado para describir aquellos determinantes genéticos extracromosomales observados en bacterias (Lederberg, 1952). Dicho término ha sido precisado para denotar a aquellos elementos circulares, covalentemente cerrados, autorreplicativos que pueden ser aislados como entidades genéticas discretas, tanto en organismos eucariotes como procariotes. Aunque los plásmidos contienen genes que confieren a las células hospederas funciones tales como la resistencia a antibióticos, metales pesados y radiaciones, la producción de endonucleasas, fijación de nitrógeno, el metabolismo de ciertos compuestos químicos, la capacidad para inducir la formación de tumores en plantas y factores de virulencia en bacterias, rara vez son esenciales para la supervivencia en el laboratorio de las células que los contienen. En la mayoría de

los casos, los plásmidos le aportan a las células portadoras ventajas genéticas para la competencia por ciertos nichos ecológicos (Crosa et al, 1994; Balbás y Bolívar, 1996).

Los plásmidos han sido utilizados como sistemas modelo para el estudio de la estructura del DNA, la caracterización de genes y el análisis de varios procesos biológicos especializados que involucran DNA, tales como la transcripción, la replicación y los rearrreglos genéticos. Sin embargo, la aplicación mas relevante ha sido indudablemente en el área de la producción de proteínas recombinantes, área que abrió, desde los 1970's, la posibilidad de obtener proteínas heterólogas en diversos organismos. Los plásmidos han sido uno de los pilares en el desarrollo de la Biotecnología Moderna basada en la recombinación de ácidos nucleicos. Hoy en día, la modificación directa del metabolismo celular, abre una nueva área de investigación y desarrollo conocida genéricamente como Ingeniería de Vías Metabólicas, donde la importancia de los plásmidos como vectores para la movilización del DNA seguirá vigente.

A dos décadas de los experimentos iniciales de DNA recombinante (Boyer y Cohen, 1973), las ventajas del uso de plásmidos han quedado plenamente establecidas, tal y como lo demuestra la variedad enorme de plásmidos reportados para usos múltiples y usos especializados (Balbás et al., 1986; Pouwels et al., 1985; Rodríguez y Denhardt, 1988). Sin embargo, el planteamiento de nuevas hipótesis generadas por el avance del conocimiento genético, ha traído como consecuencia el surgimiento de necesidades experimentales específicas, que requieren ahora de sistemas donde los plásmidos sean eliminados de la configuración genética de las células. Es cada vez mayor el número de aplicaciones, tanto de interés básico como de interés industrial, en las que los plásmidos implican problemas considerables. Independientemente del tipo de célula hospedera de que se trate, los plásmidos representan siempre una carga metabólica considerable: su replicación, y la transcripción y traducción de los genes presentes en él consumen energía e insumos estructurales celulares, lo cual afecta el funcionamiento normal de la célula hospedera. Los efectos particulares que la presencia de un plásmido genere, dependerá del sistema genético específico, pudiendo ser desde despreciables, hasta fuertemente representativos. Hoy en día, la solución a problemas experimentales debe buscarse caso por caso, según el tipo de sistema hospedero-vector.

El presente trabajo inicia una nueva área de desarrollo en el laboratorio, como respuesta a una necesidad real: la de eliminar los problemas inherentes a la presencia de plásmidos en el citoplasma de la enterobacteria *Escherichia*



*coli*, mediante la integración en el cromosoma de la información genética originalmente presente en los plásmidos.

Dos grandes áreas de investigación serán beneficiadas directamente, la expresión de genes para la producción de proteínas, y los estudios de regulación genética de genes específicos. En el área de expresión de genes para la producción de proteínas, se ha demostrado que existen múltiples factores que influyen la biosíntesis de proteínas cuando el sistema genético utilizado en *E. coli* se encuentra presente en un plásmido, y estos factores se han revisado extensamente en un trabajo previo (Balbás y Bolívar, 1990). Sin embargo en la práctica, la segregación de los plásmidos constituye el problema más frecuentemente encontrado. Este fenómeno implica la generación de células sin plásmido en procesos de fermentación, debido a la repartición defectuosa de plásmidos durante la división celular. En un ambiente altamente competitivo, la carga metabólica extra puede reducir significativamente la velocidad de crecimiento de las células productoras, y por ende el enriquecimiento de la población con células no productoras. A la fecha, la manera de contender con este problema de segregación de los plásmidos ha sido la utilización de esquemas para forzar la presencia de los plásmidos (antibióticos, sistemas de selección, etc.) y la modulación de la velocidad de crecimiento por factores ambientales (oxígeno disuelto, temperatura, composición del medio). Sin embargo, el establecimiento de condiciones específicas de cultivo para cada sistema es costoso y lleva tiempo, por lo que la integración en el cromosoma del material genético específico podría en ciertos casos resolver estas limitaciones. Otros beneficios adicionales incluyen: la eliminación de sustancias del medio de cultivo para evitar la segregación de los plásmidos, y la cancelación de cualquier problema de bioseguridad asociado a la transmisión de plásmidos entre especies.

Los estudios de regulación de la expresión de genes específicos es otra de las grandes áreas de investigación, establecidas en el laboratorio, que será beneficiada con el desarrollo de sistemas de integración genética en el cromosoma de *E. coli*. La capacidad de modificar in situ regiones cromosomales es actualmente una herramienta poderosa para el análisis de las funciones genéticas, para la interrupción dirigida o la donación de genes y la terapia génica. Si bien *E. coli* no presenta una eficiencia de recombinación genética tan elevada como otras especies (*Bacillus*, *Lactococcus*, *Streptomyces*, etc), la posibilidad de alterar su DNA cromosomal de manera dirigida ha permitido, entre otras opciones, la modificación de sus vías metabólicas para canalizar de manera diferente el flujo de carbono o nitrógeno. En el caso de estudios particulares sobre la regulación de la expresión

de genes, la interpretación de datos se ve complicada si el gene en cuestión se encuentra clonado en un plásmido con más de una copia por genoma, de aquí que la capacidad de integrar una sola copia del gene de interés, directamente en el cromosoma, represente una opción muy atractiva.

La integración cromosomal de DNA ha sido exitosamente utilizada en una gran variedad de organismos: bacterias gram positivas y negativas, hongos, plantas, levaduras, células animales, insectos, mamíferos, etc. La inactivación de genes específicos, o bien el reemplazo de genes dañados por sus copias intactas en sus *loci* originales, está abriendo un abanico de opciones para la aplicación de esta estrategia, además de las que ya han sido discutidas arriba.

En la literatura han comenzado a aparecer reportes acerca de la modificación de los sistemas ecológicos por la liberación al ambiente de microorganismos alterados genéticamente. La aplicación de cepas microbianas para la biorremediación o el control biológico de algunas pestes requiere de esquemas en los cuales la transferencia horizontal de genes, la inestabilidad de vectores y la presencia de genes heterólogos, sean eliminados del contexto genético de dichas cepas. Por esto, la integración en cromosoma de la información genética contenida en los plásmidos y elementos móviles, se percibe en el corto plazo como la estrategia más adecuada, en lo general, para la construcción de microorganismos seguros (Yee y Kronstadt, 1995; Herrero et al., 1990; de Lorenzo et al., 1990).

El área de la salud humana será beneficiada por las técnicas de reemplazo de genes, ya que se ha demostrado que pueden construirse organismos mutantes en aquellas funciones que presentan toxicidad para el humano y otros mamíferos económicamente significativos. Estas técnicas de noqueo de genes ("knockout") están siendo evaluadas para la producción de cepas atenuadas y vacunas (Cruz et al., 1991; Cockle et al., 1991; Webb y McMaster, 1994; Cooper et al., 1993).

Finalmente, el reemplazo de genes *in situ* se vislumbra como la meta de las terapias génicas del futuro. Si bien se han desarrollado sistemas de integración para el reemplazo de genes dañados en células en cultivo (Berinstein et al., 1992, Zou et al., 1994), embriones de mamíferos (Hasty et al., 1991; Gondo, et al, 1994), células cancerosas (Gutiérrez, et al., 1992), ratones *in vivo* (Kühn et al., 1995) y en mitocondrias (Seibel et al., 1995), aún queda bastante por hacer para lograr modificar de una manera dirigida los genes en un ser superior. Sin embargo, la generación de conocimientos, conjuntamente con la evolución de métodos y técnicas en diferentes sistemas biológicos, sugieren fuertemente que lo que hoy

son expectativas, serán realidad a mediano o largo plazo. Con base en las justificaciones y antecedentes expuestos, se planteó el siguiente objetivo.

## OBJETIVO

Diseñar, construir, caracterizar y validar un sistema genético para permitir la integración y/o sustitución de genes clonados, en el cromosoma de la enterobacteria *E. coli*. Desarrollar un procedimiento general para su utilización y demostrar su eficiencia con diversos genes.

## GENERALIDADES

### 1. SISTEMAS MODELO DE INTEGRACION DE GENES ESPECIFICOS EN EL CROMOSOMA DE *E. coli*.

Existen tres grandes estrategias para lograr la integración cromosomal de secuencias de DNA que pueden ser aplicadas en cualquier tipo celular, siempre y cuando existan las herramientas adecuadas: integración por recombinación homóloga doble de DNA, integración sitio-específica y la integración azarosa de fragmentos de DNA. A continuación se describe brevemente cada una de éstas, así como sus ventajas y desventajas.

1.1. Integración de secuencias de DNA por recombinación homóloga doble. El proceso de recombinación de dos DNAs homólogos es un proceso generalizado en las células de todo ser vivo, cuya función ha sido asociada a la evolución de los cromosomas. En organismos procariotes se encuentra íntimamente relacionada con eventos de replicación y reparación de DNA, mientras que en eucariotes, la recombinación homóloga ocurre principalmente durante la meiosis (oogénesis o espermatogénesis). Esta reacción sucede entre dos moléculas de DNA, y depende exclusivamente de la presencia de secuencias idénticas de DNA de cierta longitud (100 pb o mayores en procariotes o mas de 300 pb en eucariotes) que son utilizados como substratos en una serie de procesos enzimáticos específicos (Shen y Huang, 1986). La recombinación genética involucra el intercambio físico de partes, por lo que existe un rompimiento de DNA seguido por una unión. El mecanismo por el cual sucede esto, está dado por la complementariedad de hebras sencillas del DNA, y la frecuencia de recombinación no es constante en todo el

genoma, y es influenciada por efectos tanto locales como globales. En la Tabla 1 se describen las características de estos mecanismos (Craig y Kleckner, 1987).

Tabla 1. Características de los mecanismos de recombinación homóloga doble entre dos moléculas de DNA.

1. La recombinación ocurre en sitios específicos en ambas moléculas de DNA participantes.
2. La recombinación es recíproca, por lo que ambos productos de la recombinación se recuperan.
3. La recombinación es conservativa, ya que el intercambio de las cadenas sencillas del DNA se logra por el rompimiento y unión precisas de las moléculas sin añadir un solo nucleótido extra de DNA.
4. Las moléculas participantes comparten una región de homología en la cual ocurre el intercambio de hebras sencillas.

Entre los métodos de integración de DNA por recombinación homóloga doble descritos a la fecha para *E. coli* se encuentran: la integración y resolución de plásmidos cointegrados en cepas *polA* (Gutterson y Koshland, 1983; Saarilathi y Palva, 1985, Hamilton et al., 1989); la transformación de cepas *recBC sbcB* o *sbcC* con DNA lineal o superenrollado (Jasin and Schimmel, 1984; Winans et al., 1985; Oden et al., 1992); el uso de plásmidos (Skrzypek, et al., 1992) o bacteriófagos incapaces de replicarse en cepas mutadas en ciertos loci (Blum et al., 1989); y el uso de entrecruzamiento vía Hfr (de Wind et al., 1985; Parker y Marinus, 1988). La idea detrás de todos estos sistemas es la de introducir a la célula el DNA que se desea integrar, flanqueado por fragmentos de DNA homólogos al sitio de integración (secuencia blanco). Asimismo, el sistema debe contener un esquema de selección para poder distinguir aquellas colonias silvestres de las colonias con la integración, y por supuesto algún método para eliminar el vehículo utilizado para la transformación del DNA de interés. La ventaja primordial de este tipo de sistema de integración es que se conoce de antemano el sitio blanco, mientras que efectos tales como la eficiencia y frecuencia de integración son variables según el sistema elegido.

1.2. Integración azarosa mediada por elementos transponibles. Los elementos transponibles son segmentos discretos de DNA que tienen la capacidad de moverse (transponerse) a sitios nuevos en el genoma de sus células hospederas. Estos elementos genéticos han sido encontrados en una gran variedad de organismos eucariotes y procariotes, en los cuales causan mutaciones por inserción o bien al promover rearrreglos cromosomales por inversión, deleción, o duplicación. El proceso de transposición es independiente de la recombinación homóloga clásica

mediada por los sistemas *rec*, y la inserción de un elemento transponible en el genoma no requiere de una homología extensa de DNA entre los extremos del elemento y su sitio blanco (Lewin, 1994). Los elementos transponibles de origen procariote pueden clasificarse en cuatro grupos:

1. Clase I que engloba los elementos simples denominados secuencias de inserción (elementos IS), que tienen aproximadamente entre 750 y 1,600 pb de longitud. Estos elementos consisten normalmente en un gene que codifica una enzima que se requiere para la movilización (transposasa), flanqueada por secuencias repetidas de DNA entre 4 y 11 pb, que sirven de substrato a dicha transposasa para efectuar su escisión y subsecuente inserción en otro sitio del cromosoma.

2. Clase II, llamados elementos transponibles compuestos o transposones. Estos son más complejos que las secuencias de inserción, ya que además de contener una transposasa y sus secuencias repetidas, ya sean directas o invertidas, contienen además genes no relacionados con la función de transposición, tales como la resistencia antibióticos, la resistencia a metales pesados o determinantes antigénicos. Son de longitudes variables y presentan algunas preferencias por los sitios de transposición.

3. Clase III, que incluye bacteriofagos capaces de efectuar transposiciones, como es el caso de Mu y bacteriófagos similares, que son a su vez bacteriofagos y transposones. Se insertan al azar en el DNA con una elevada frecuencia.

4. La última categoría contiene transposones que no caben en ninguna de las clases anteriores, como el Tn7 que se integra en sitios precisos en el cromosoma bacteriano (Craig, 1991), por lo que entra en la clasificación siguiente de integración sitio-específica.

Los elementos transponibles han sido extensamente modificados con el fin de utilizarlos como vehículos moleculares y herramientas para el estudio de eventos de recombinación y mutagénesis de DNA. Los transposones, en particular, han sido desarrollados como vehículos para la integración de DNAs específicos siguiendo un plan sencillo: el DNA de interés es clonado junto con un marcador de selección entre las secuencias repetidas. La transposasa promueve la integración del material genético contenido entre dichas secuencias, y el cultivo infectado es seleccionado en el medio adecuado. Transposones como Tn5 pueden ser mantenidos como plásmidos en cepas específicas, las cuales se usan como

intermediarios para la producción masiva del transposón, por lo que su purificación es sencilla (de Lorenzo et al., 1990; Herrero et al., 1990; Herrero et al., 1993). Sin embargo, aunque la inespecificidad en el sitio de integración puede ser ventajosa en estudios de aislamiento y mutagénesis de genes, es una gran desventaja en aplicaciones donde es indispensable conocer la localización exacta de la inserción. Además, la movilización continua de estos elementos, debe ser eliminada para aplicaciones que involucren, por ejemplo, la liberación ambiental de microorganismos modificados genéticamente (Herrero, et al., 1990).

1.3. Integración sitio-específica de DNA en el cromosoma. La recombinación de este tipo es mediada por pares de bases específicos en el DNA, y ha sido bien caracterizada en procariotes. Los eventos de integración homóloga sencilla y la integración de bacteriófagos en sus sitios de unión característicos caen dentro de esta categoría. En el caso de la integración homóloga sencilla, se produce, como su nombre lo indica, una fusión de dos moléculas de DNA homólogas mediadas por regiones parecidas, siendo generalmente el cromosoma con una molécula de DNA circular.

Algunos bacteriófagos lisogénicos también caen dentro de esta categoría, ya que requieren de sitios específicos (*att*) para integrarse en el cromosoma. Aunque estos sitios de *att* presentan homología con secuencias del fago, las enzimas involucradas en este evento actúan solamente sobre dicho sitio de unión en el cromosoma y en el fago. Evidentemente se conoce la localización de la integración, ya que los sitios de *att* para diversos fagos están bien caracterizados. Dentro de este grupo cabe una familia de transposones derivados del Tn7 que se integra en sitios específicos del cromosoma bacteriano (Craig, 1991).

Sin embargo, en estos esquemas de integración es una gran desventaja el hecho de no poder efectuar reemplazo de alelos, así como el hecho de que se produce la integración completa de la molécula (Diedrich et al., 1992).

## 2. SELECCION DEL SISTEMA DE INTEGRACION.

Con base en la información presentada anteriormente, se determinaron tanto los aspectos más deseables como los más indeseables de cada uno de los sistemas conocidos, a modo de tratar de incluir los primeros y eliminar los segundos, con el fin de diseñar una estrategia para la construcción de un nuevo sistema de integración de DNA clonado para *E. coli*. Se escogió la estrategia general de recombinación homóloga doble de DNA en un sitio conocido del cromosoma bacteriano, y si bien este sistema no es perfecto para todo tipo de aplicaciones,

presenta ventajas considerables con respecto a otros sistemas reportados. Los componentes del sistema prototipo tienen las siguientes características:

1. El gene blanco, esto es, el gene donde se lleva a cabo la integración por recombinación homóloga es *lacZ*. Este gene ha sido mapeado en el cromosoma de *E. coli*, a 24 minutos de *oriC*, el origen de replicación. La enzima  $\beta$ -galactosidasa, codificada por *lacZ*, hidroliza el galactósido cromogénico X-gal, que es fácilmente detectable por su color azul en cajas con medio sólido, por lo que la interrupción de este gene, por integración de material genético, permite una selección fenotípica directa (colonias blancas).

2. El vector es un plásmido con el gene de resistencia a ampicilina como marcador de selección y con el origen de replicación derivado del pBR322 (Bolivar et al., 1977). Para que la recombinación se lleve a cabo a nivel del gene cromosomal *lacZ*, el vector posee dos regiones de DNA de aprox. 1 Kb, con perfecta homología a este gene, aunque carentes de las regiones que codifican para los extremos amino y carboxilo terminales. Entre ambos fragmentos de *lacZ* se tienen varios sitios de restricción para clonar el DNA de interés, así como un gene de resistencia a un antibiótico, que se integra conjuntamente con el gene clonado y es útil como marcador de selección para las colonias con integraciones.

3. La cepa receptora, donde se integra el material genético a nivel cromosomal, es *E. coli* K-12 ATCC47002 (F, *lacZ*<sup>+</sup>, *leu-6*, *his-4*, *ara-14*, *recB21*, *recC22*, *sbcB15*, >); Wyman et al, 1985). Esta cepa tiene dos características importantes para el sistema que aquí se presenta: (i) el fenotipo denominado hiper-recombinante, que se manifiesta como una frecuencia de recombinación  $10^3$  veces mayor a la cepa silvestre, y que esta dada por la mutación en el locus *sbcB* (Taylor, 1988); y (ii) la incapacidad de mantener plásmidos con el origen de replicación tipos ColE1 y pSC101, que está dada por las mutaciones en la enzima multifuncional RecBCD (Biek et al., 1986; Taylor, 1988). El efecto polar que ejercen las mutaciones *recB21* y *recC22* sobre *recD* es el de evitar la resolución de plásmidos en forma discreta durante la replicación de los mismos, promoviendo la concatamerización de las moléculas en multímeros que son naturalmente eliminados de un cultivo por procesos de segregación. Además, esta cepa es *lacZ*<sup>+</sup>, por lo que la selección por color mencionada anteriormente es viable. Finalmente, la información genética integrada en el cromosoma de ATCC47002 puede ser transferida a otras cepas, mediante técnicas de movilización de DNA, tales como la transducción del DNA mediada por el bacteriófago P1 o conjugación.

4. Las condiciones de cultivo son muy laxas, ya que la cepa tiene pocos requerimientos especiales de nutrimentos. Los antibióticos y los substratos cromogénicos para seleccionar la integración, se utilizan exclusivamente durante la construcción de las cepas.

Como primer paso para demostrar la viabilidad de este sistema, se diseñó y se construyó un vehículo molecular de integración prototipo con el fin de verificar la funcionalidad del sistema y su eficiencia. De esta primera etapa de trabajo se publicó un artículo en la revista internacional GENE, que se incluye en el Capítulo 2.

En una siguiente etapa del trabajo, se construyeron tres vectores mejorados que constituyen un grupo de herramientas más versátiles para el uso del sistema. Esta colección de tres vectores permiten seleccionar por tres antibióticos distintos: cloranfenicol, gentamicina, o kanamicina, y además poseen una mayor cantidad de sitios de restricción para clonación de DNA. A partir de uno de estos vectores, se realizaron experimentos sobre la expresión de un mismo gene (*cat*) presente en plásmido multicopia y en forma integrada. Con esta información se publicó otro artículo en la revista GENE que se presenta en el capítulo 3. En reconocimiento a la labor desarrollada por el grupo en el área de expresión de genes, se recibió una invitación para escribir un artículo sobre el diseño de plásmidos de expresión para *E. coli* (Balbás, 1996).

El interés para integrar en *E. coli* un gene sintético altamente inestable, fue manifestado por la Compañía Protein Polymer Technologies Inc. de La Jolla, California. En el Capítulo 4 se describen los esfuerzos realizados en el laboratorio por manejar dicho gene, el análisis de los problemas encontrados y los resultados obtenidos a la fecha.

Finalmente, en el Capítulo 5 de esta tesis se discutirá el impacto global de este trabajo, así como las perspectivas futuras en cuanto a nuevas áreas de incidencia y desarrollo de proyectos.



# 2

## CONSTRUCCION DEL SISTEMA PROTOTIPO PARA LA INTEGRACION POR RECOMBINACION HOMOLOGA DOBLE PARA *E. coli*.

En esta publicación se integraron y se describen los siguientes elementos:

1. La construcción del vehículo molecular prototipo para la integración del DNA clonado in vitro.
2. La interrupción del gene *lacZ* silvestre en la cepa ATCC47002 por el gene *cat*, que codifica para la enzima transacetilasa de cloranfenicol. Este gene se utilizó como marcador de selección además del sistema de selección aportado por la enzima  $\beta$ -galactosidasa.
3. La evaluación de la eficiencia de integración, la movilización de los genotipos a otras cepas por transducción y el comportamiento general del sistema.
4. La validación del sistema utilizando un gene extraño a *E. coli* como pasajero del vector.
5. El diseño y la utilización de un sistema para la verificación de la integración en el locus genético esperado mediante técnicas de PCR.

GENE 07501

## Plasmid pBRINT: a vector for chromosomal insertion of cloned DNA

(Homologous recombination; cloning vector; PCR; P1 transduction; *lacZ*; *cat*; *Vitreoscilla* sp.; hemoglobin gene)

Paulina Balbás, Xochitl Alvarado, Francisco Bolívar and Fernando Valle

Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, México

Received by J. Messing: 13 April 1993; Revised/Accepted: 16 July/21 June 1993; Received at publishers: 9 August 1993

### SUMMARY

Plasmid pBRINT is a pBR322 derivative [Bolívar et al., *Gene* 2 (1977) 95–113; Balbás et al., *Gene* 50 (1986) 3–40] that allows the insertion and replacement of DNA sequences into the *Escherichia coli* chromosome by homologous recombination. This method uses the inability of *E. coli* strain ATCC47002 (JC7623) to replicate covalently closed circular (ccc) pBR322-derived plasmids, and the convenience of XGal+IPTG screening for recombinants. The vector also contains suitable selection markers (Ap and Cm), as well as a multiple cloning site (MCS) derived from the pUC vectors [Yanisch-Perron et al., *Gene* 33 (1985) 103–119] to facilitate cloning. A simple PCR scheme was developed to scan for DNA insertions into the bacterial chromosome. Once introduced into the chromosome, the inserted DNA sequences can be transferred to other strains by bacteriophage P1-mediated transduction.

### INTRODUCTION

Among the multiple approaches designed to overcome the limitations inherent in the use of multicopy plasmids in *E. coli*, introduction of DNA fragments into the chromosome by homologous recombination has proven to be effective. In this report, we describe a general cloning system with the following attributes: (i) site-directed gene insertions at the *lacZ* locus into the *E. coli* chromosome

using a pBRINT plasmid with convenient MCS, (ii) the use of strain ATCC47002 ( $F^-$ , *lacZ*<sup>+</sup>, *leu*-6, *his*-4, *ara*-14, *recB*21, *recC*22, *sbc*15,  $\lambda^-$ ; Wyman et al., 1985) that does not replicate ColE1-type plasmids extrachromosomally, and upon transformation with ccc plasmids by standard procedures exhibits an efficient recombination and proficient growth, (iii) a selection method to screen for segregation of unintegrated plasmids, (iv) a simple selection scheme for plasmid integrates, and (v) a simple method for the characterization of insertions into chromosomal DNA.

*Correspondence to:* Dr. F. Valle, Departamento de Biología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 510-3, Cuernavaca, Morelos, CP 62271, México, Tel. (52-73) 17-23-99; Fax (52-73) 17-23-88.

Abbreviations: aa, amino acid(s); Ap, ampicillin;  $\beta$ Gal,  $\beta$ -galactosidase; bp, base pair(s); CAT, Cm acetyltransferase; *cat*, gene encoding CAT; ccc, covalently closed circular; Cm, chloramphenicol; *hemo*, hemoglobin-encoding gene; IPTG, isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside; kb, kilobase(s) or 1000 bp; MCS, multiple cloning site(s); nt, nucleotide(s) (number or sequence); oligo, oligodeoxynucleotide; *ori*, origin of DNA replication; p, plasmid; *P*, promoter; PCR, polymerase chain reaction; pfu, plaque-forming units; Polk, Klenow (large) fragment of *E. coli* DNA polymerase I; <sup>R</sup>, resistance/resistant; <sup>S</sup>, sensitive/sensitivity; XGal, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside.

### EXPERIMENTAL AND DISCUSSION

#### (a) Homologous recombination of pBRINT

The restriction map of pBRINT is shown in Fig. 1. Transformation of ATCC47002 with ccc pBRINT was performed by standard procedures (Sambrook et al., 1989). Integration of *cat* from pBRINT into the chromosomal *lacZ* locus proceeded by homologous double crossover recombination of the pBRINT *lacZ* flanking sequences (Oden et al., 1990). Phenotypically, detection

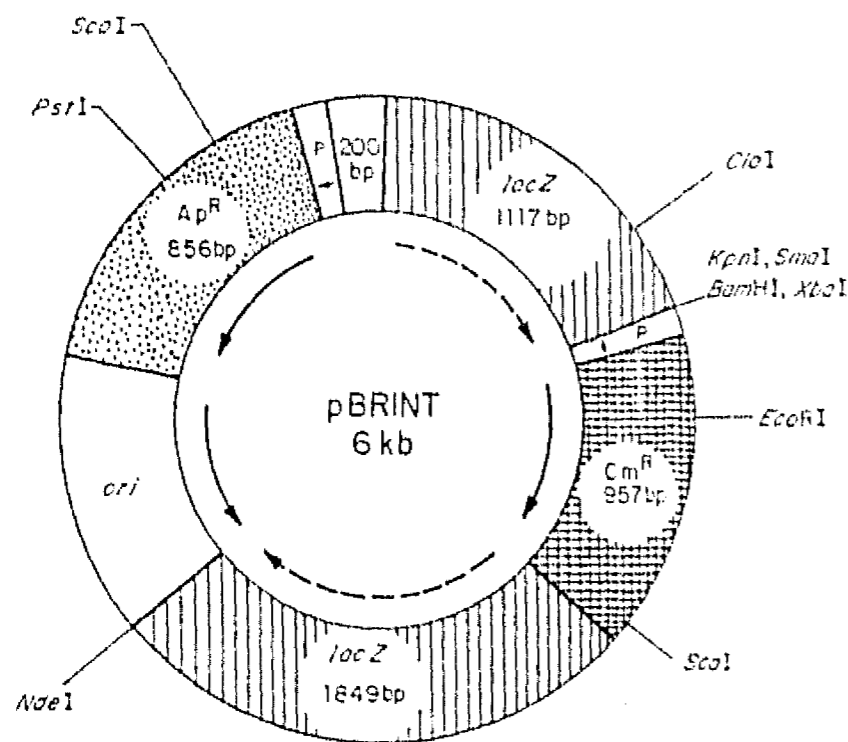


Fig. 1. Restriction map of pBRINT. A promoterless 2966-bp fragment of *lacZ* (starting at aa 8 of  $\beta$ Gal) was tailored into pBR322. A transcriptionally active  $Cm^R$  cassette with a MCS derived from pCAT19 (Fuqua, 1992) was inserted into the unique *EcoRV* site of *lacZ* to yield pBRINT (details of the construction will be supplied upon request). Therefore, in pBRINT the *lacZ* sequence is interrupted by *cat*, and both genes are oriented clockwise. The GenBank accession number of the complete nt sequence is L25311.

of the insertion in the chromosome was performed on plates containing 10  $\mu$ g Cm, XGal and IPTG per ml. Approximately 200 colonies per ng of transforming ccc plasmid were obtained, and 1% of them were white  $Cm^R$  colonies for the first 24 h of incubation at 37°C. Replica-plating on Ap and Cm plates revealed that 50% of the colonies that were originally blue,  $Ap^R$ ,  $Cm^R$ , turned white  $Ap^S$ - $Cm^R$  after another 48 h incubation at 37°C.

White,  $Ap^S$ ,  $Cm^R$  colonies were analyzed by Southern blotting to confirm integration of DNA (data not shown). The  $Cm^R$ -carrying fragment integrated into the chromosome was transferred by PI-mediated transduction to strain JM101 (Silhavy et al., 1984). Transductants were screened on XGal+IPTG plates for white,  $Cm^R$  colonies, which were confirmed by Southern blot analysis to carry the integrated fragment (data not shown).

In order to test pBRINT's efficiency of heterologous DNA recombination we used the *Vitreoscilla* sp. *hemo* gene. This gene was obtained within a 1350-bp *HindIII*-*Sall* DNA fragment from plasmid pUC8-15 (Dickshit and Webster, 1988), blunt-ended with *Pollk*, and cloned into the *SmaI* site of pBRINT to yield pBRINT-hemo, which was transformed into strain ATCC47002. Transformants were selected as described for pBRINT; no variation in the efficiency was found. Additionally, colonies bearing the integrated DNA exhibited a reddish color after 72 h incubation at 37°C, indicating that the *Vitreoscilla* sp. *hemo* gene was active in *E. coli* as previously reported (Khosla and Bailey, 1988). This con-

struction was transferred to JM101 by PI-mediated transduction (Silhavy et al., 1984);  $Cm^R$  colonies of reddish color were selected. The efficiency of this procedure is very high, yielding approximately one  $Cm^R$  reddish colony per 40 pfu.

#### (b) Chromosomal DNA analysis by PCR

Southern blot analysis (to confirm the integration event) is a time-consuming procedure, so to simplify the system, we developed an alternative method for the chromosomal DNA analysis of mutants. We employed amplification of chromosomal DNA by PCR and analysis of the size of the amplified fragments. Three 30-mer oligos were designed so that they hybridize to sequences present in the vector. Fig. 2a presents the nt sequence and the exact hybridization sites of these oligos, as well as the expected sizes of the DNA fragments of each construction, both for the vector and for pBRINT-hemo. Fig. 2b shows the results obtained from the integration of pBRINT and pBRINT-hemo into the ATCC47002 chromosome. As can be seen, the PCR-generated fragments exhibited the expected size, confirming that the homologous recombination proceeded. This construction was transduced into strain JM101, two randomly chosen colonies were subjected to PCR and DNA fragments of the appropriate sizes were obtained (data not shown).

#### (c) Conclusions

(1) Plasmid pBRINT permits site-directed gene insertions at the *lacZ* locus of the *E. coli* chromosome. The plasmid contains a convenient MCS and carries two selection markers to screen for segregation of unintegrated plasmids and positive selection of integrates respectively.

(2) The recipient strain is ATCC47002, that does not replicate ColE1-type plasmids extrachromosomally. This strain can be transformed by ccc plasmids by standard procedures and exhibits efficient transformation and proficient growth.

(3) A PCR-based method has been developed for the characterization of chromosomal DNA insertions.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr. C.W. Fuqua and Dr. D.A. Webster for providing strains, and Mercedes Enzaldo, Paul Gaytan, Eugenio Bustos and Noemi Flores for their technical assistance. This work was supported by grants IN300891 from DGAPA, U.N.A.M., and 0248-N9107 and 2031-Ng302 from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México.

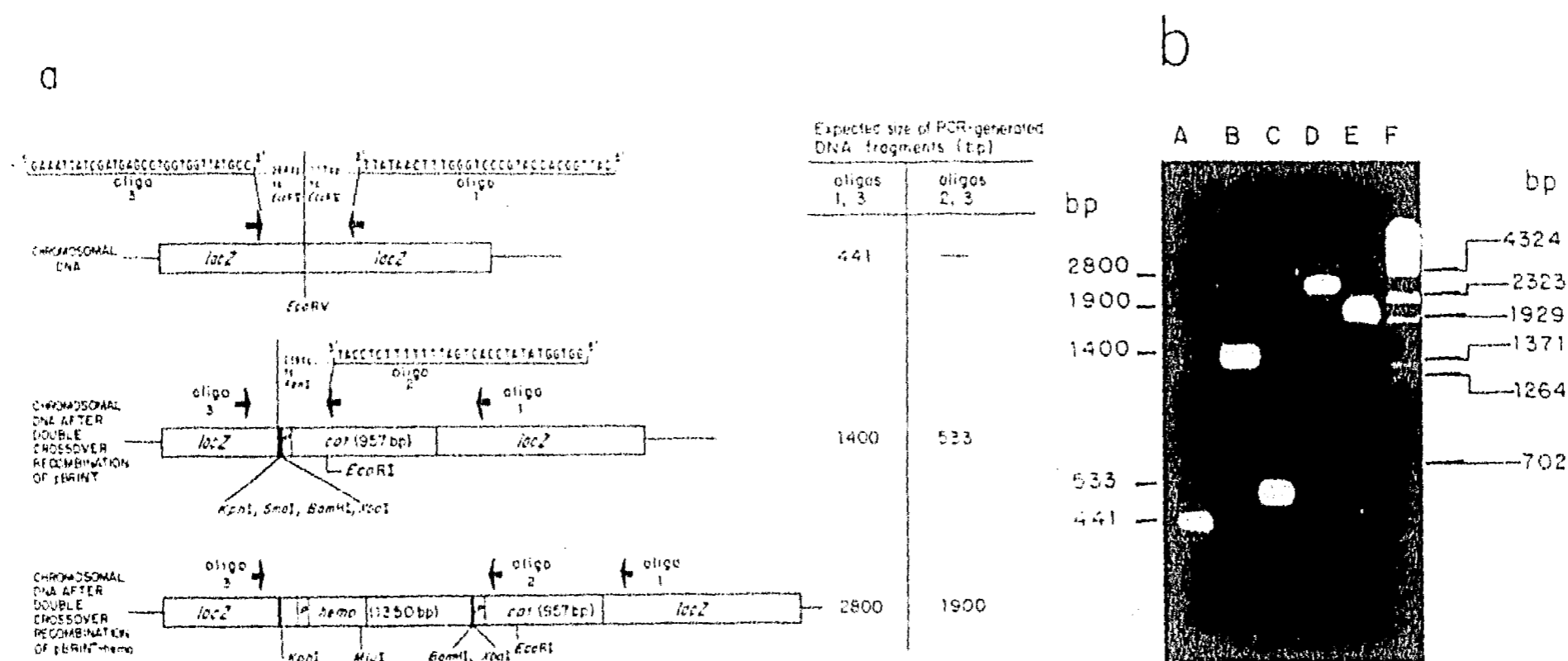


Fig. 2. Strategy for the characterization of chromosomal DNA of recombinant strains. (a) The sequences of the universal oligos designed for PCR generation of DNA fragments from chromosomal DNA are underlined and the positions where they hybridize are marked with heavy arrows. The orientation of the *Vitreoscilla* sp. *hemo* gene is clockwise. Distances between the oligos and the unique *EcoRV* site are indicated. Maps are not drawn to scale. (b) Pattern of the PCR-generated DNA fragments after electrophoresis in a 1.2% agarose gel. Lanes: A, wild-type ATCC47002 chromosomal DNA amplified with oligos 3 and 1; lanes B and C, ATCC47002 chromosomal DNA after recombination with pBRINT amplified, using oligos 3 and 1, or oligos 3 and 2, respectively; D and E, ATCC47002 chromosomal DNA after recombination with pBRINT-hemo amplified using oligos 3 and 1, or oligos 3 and 2, respectively; F, molecular weight DNA markers (see right margin for sizes).

#### REFERENCES

- Balbás, P., Soberón, X., Merino, E., Zurita, M., Lomeli, H., Valle, F., Flores, N. and Bolívar, F.: Plasmid vector pBR322 and its special-purpose derivatives - a review. *Gene* 50 (1986) 3-40.
- Bolívar, F., Rodríguez, R.L., Greene, P.J., Betlach, M.C., Heyneker, H.L., Boyer, H.W., Cross, J.H. and Falkow, S.: Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene* 2 (1977) 95-113.
- Dickshit, K.L. and Webster, D.A.: Cloning, characterization and expression of the bacterial globin gene from *Vitreoscilla* in *Escherichia coli*. *Gene* 70 (1988) 377-386.
- Fuqua, W.C.: An improved chloramphenicol resistance gene cassette for site-directed marker replacement mutagenesis. *BioTechniques* 12 (1992) 223-225.
- Khosla, C. and Bailey, J.E.: The *Vitreoscilla* hemo gene: molecular cloning, nucleotide sequence and genetic expression in *E. coli*. *Mol. Gen. Genet.* 214 (1988) 158-161.
- Oden, K.L., DeVaux, L.C., Vibat, C.R.T., Cronan Jr., J.E. and Gennis, R.B.: Genomic replacement in *Escherichia coli* K-12 using covalently closed circular plasmid DNA. *Gene* 96 (1990) 29-36.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T.: *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
- Silhavy, T.J., Berman, M.L. and Enquist, L.W.: *Experiments with Gene Fusions*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1984.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. and Messing, J.: Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33 (1985) 103-119.
- Wyman, A.R., Wolfe, L.B. and Botstein, D.: Propagation of some human DNA sequences in bacteriophage  $\lambda$  vectors requires mutant *E. coli* hosts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 (1985) 2880-2884.

# 3

## CONSTRUCCION DE NUEVOS VECTORES DE INTEGRACION CROMOSOMAL BASADOS EN EL SISTEMA PROTOTIPO

En esta publicación se integra y se describen los siguientes elementos:

1. La construcción de tres plásmidos relacionados al plásmido prototipo pBRINT que presentan características mejoradas.
2. La validación de los tres plásmidos como vectores de integración, la medición de sus eficiencias de integración con genes clonados o sin ellos, y la comprobación del sitio de integración de éstos usando el sistema de PCR descrito en el artículo del Capítulo 2.
3. La medición de las actividades enzimáticas de CAT en cultivos con uno y dos copias del gene en el cromosoma, comparándolas con la actividad obtenida a partir de plásmidos multicopia.

## A pBRINT family of plasmids for integration of cloned DNA into the *Escherichia coli* chromosome

(Recombinant DNA; *Vitreoscilla*, hemoglobin, luciferase)

Paulina Balbás, Mikhail Alexeyev<sup>a</sup>, Inna Shokolenko<sup>a</sup>, Francisco Bolivar and Fernando Valle\*

Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, México, <sup>a</sup>, Louisiana State University Agricultural Center, Rice Research Station, Crowley, Louisiana, USA, and Institute of Molecular Biology and Genetics, Kiev, Ukraine.

\*Correspondence to: Dr. Fernando Valle, Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, UNAM, Apdo. Postal 510-3, Cuernavaca, Morelos CP62271, MEXICO. Tel. (52-73) 17-23-99; Fax (52-73) 17-23-88; e-mail: valle@ibt.unam.mx

### Abbreviations:

Anb, antibiotic; Ap, ampicillin; bp, base pair(s); *cat*, gene coding for CAT; CAT, Cm acetyl transferase; ccc, covalently closed circular; Cm, chloramphenicol; Gm, gentamycin; IPTG, isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside; kb, kilobase(s) or 1000 bp; Km, kanamycin; LB, Luria-Bertani medium; MCS, multiple cloning site(s); oligo, oligodeoxyribonucleotide; *ori*, origin(s) of DNA replication; <sup>R</sup>, resistant/resistance; Sm, streptomycin; Tc, tetracycline; XGal, 5-bromo-4chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside.

## SUMMARY

Plasmid pBRINT is an efficient vector for chromosomal integration of cloned DNA into the *lacZ* gene of *Escherichia coli* [Balbás et al., Gene 136(1993) 211-213]. A family of related plasmids containing different antibiotic-resistance markers (Cm<sup>R</sup> or Gm<sup>R</sup> or Km<sup>R</sup>) and a larger multiple cloning site (MCS) has been constructed. This set of plasmids, whose integration efficiencies are as good as those obtained with the prototype plasmid pBRINT, constitute a collection of tools that allow rapid and easy integration of cloned DNA, at the chromosomal level. Their functionality as integration vectors has been ascertained by integrating the *Vitreoscilla* sp. hemoglobin-encoding gene and the *Photobacterium leiognathi lux* genes. To evaluate the level of expression obtained after chromosomal integration, we constructed strains carrying one or two copies of the *cat* gene integrated in the chromosome, and compared their enzymatic activities with those obtained from a strain carrying *cat* in a multicopy plasmid

## INTRODUCTION

The integration of cloned DNA into the chromosome of the host organism is advantageous over its establishment on a replicative plasmid vector with respect to stability or to undesired copy number effects. Also, DNA integration bypasses problems inherent to the use of selective agents in the culture medium. Three general approaches have been reported in the literature: integration by double-crossover recombination (Oden et al., 1990); site-specific-mediated integration in distinctive DNA sites, like phage attachment sites (see, e.g., Diedrich et al., 1992) and transposon-mediated random integration (Herrero et al., 1990).

Plasmid pBRINT has been constructed to deliver genetic material for genomic integration into the *Escherichia coli* chromosome by double crossover homologous recombination (Balbás et al., 1993). This system is based on the inability of strain ATCC47002 (F<sup>-</sup>, *lacZ*<sup>+</sup>, *leu-6*, *his-4*, *ara-14*, *recB21*, *recC22*, *sbcB15*,  $\lambda$ ; Wyman et al., 1985) to maintain ColE1 derivatives. Mutations in the *recBC* loci have a polar effect on the downstream *recD* locus, affecting recombination and increasing the frequency of plasmid multimer formation. Plasmid concatemerization leads to their segregation and loss from the cells in just a few generations (Biek and Cohen, 1986). Providing that the plasmid contains a selectable marker, its segregation can be easily monitored on solid media. The integration target of pBRINT is the *lacZ* gene, which also permits a blue-white

selection of integrants, when the chromogenic substrate XGal and the inducer IPTG are included in solid medium. The aim of this study was to construct derivatives of pBRINT carrying new selection markers and longer MCS.

## EXPERIMENTAL AND DISCUSSION

### (a) Construction, integration and transduction of pBRINT derivatives

A diagram of the structural features of the new pBRINT plasmids is shown in Fig. 1. For the selection of the integrated DNA, the following procedure was developed. Freshly prepared plasmid DNA was transformed into ATCC47002 as previously reported (Balbás et al., 1993). Approximately 200 colonies per ng of transforming plasmid were obtained after selecting for white phenotype on solid media containing XGal, IPTG and the appropriate Anb (10 µg Cm/, 5 µg Gm/, 7.5 µg Km, all per ml). After 24 h of incubation at 37°C, at least 1% of the colonies were white. White colonies grew larger than the blue ones and were well visible when the incubation period was extended. The Ap<sup>R</sup> colonies were replica-plated on the appropriate Anb and on Ap. Only white, Ap<sup>S</sup> colonies indicated plasmid loss. The marker exchange was confirmed by Southern hybridization techniques (data not shown).

The integrated DNA was transduced to other strains using bacteriophage P1 in order to prove that the mutation can be moved to other strains. The P1 phage lysates were prepared on a single white colony from each experiment and utilized to transduce the DNA from ATCC47002 to other phage-sensitive strains (Silhavy et al., 1984). After infecting with the P1 lysate, transductants were plated on LB agar containing the proper Anb, XGal and IPTG. DNA integration was confirmed by a PCR scheme described previously (Balbás et al., 1993) as shown in Fig. 2. Strains JM101, TG1, W3110, S17-1, Dh5α and BW19795 were successfully used as recipients of P1 bacteriophage.

### (b) The pBRINT plasmids as cloning and integration vectors

To corroborate the ability of the new set of pBRINT plasmids to deliver heterologous genes into the *E.coli* chromosome, the *Vitreoscilla* sp. hemoglobin-encoding gene contained on a 1.4 kb fragment (Dickshit and Webster, 1988) and the *Photobacterium leiognathi lux* genes (Ptitsin et al., 1988) carried in a 7.5 kb fragment, were utilized. Their integration into chromosome was confirmed by PCR as outlined in section a. Phenotypic expression of both genes was monitored visually due to their properties: colonies harboring active *lux* genes



glow in the dark, and expression of the hemoglobin gene results in reddish colonies after 72 h of incubation. For all of them, integration efficiencies were 1 to 2%, being similar to those reported for the original pBRINT (Balbás et al., 1993).

### (c) Gene expression comparisons

Production of proteins in *E. coli* from a single copy of the gene of interest integrated into the chromosome, might prove to be an interesting alternative. It could (i) circumvent the cost and other implications of using selection pressure agents during fermentation, (ii) prevent low or variable yields due to plasmid segregation, and (iii) increase the availability of energy and metabolic resources due to a lower metabolic load in plasmid-free cells.

It was originally accepted that the amount of synthesized protein increased with the gene dosage (Balbás and Bolivar, 1991). However, for several organisms it has been shown that when the copy number of a gene was low (whether contained on a plasmid or integrated in the chromosome), a linear dose/response was usually encountered. No relation of gene dosage to the amount of produced protein was observed for strains with plasmid copy numbers higher than 7. In general, with higher plasmid copy numbers the production levels were lower than expected (Kalio et al., 1988; Verdoes et al., 1995).

To compare the yield of CAT enzymatic activity from single and multiple gene copies, we measured the specific activity of CAT encoded by *cat* present on pBRINT.Cm, either contained in a multicopy plasmid or as one copy integrated in the chromosome. This particular *cat* cassette contained its own constitutive promoter, so the differences in CAT activity did not reflect titration of regulatory proteins. During the construction of the original pBRINT (Balbás et al., 1993), a plasmid containing two tandemly repeated, counterclockwise oriented *cat* genes was obtained. A strain carrying these two copies integrated in the chromosome (JM101::DUPL) was also included in this study. Fig. 3 presents the data obtained from this analysis. Cells containing one and two copies of *cat* integrated in the chromosome, exhibited a similar pattern of CAT activity with a two-fold difference in the numerical values in both the exponential and the stationary growth phases, indicating that *cat* expression was maintained at the same ratio as the total protein production. A basal CAT activity detected in the wild-type strain used as a control was subtracted from the experimental values obtained. On the contrary, cells containing *cat* on a multicopy plasmid compared to the chromosomal monocopy exhibited six-fold higher CAT level during logarithmic growth, and twenty four-fold higher expression during the stationary phase. If we assume that

for pBR322-derived plasmids, the copy number was around 20 copies in the stationary phase (Covarrubias et al., 1981), then the production of CAT specific activity reflected a linear gene dosage/protein synthesis in this phase.

#### (d) Conclusions

(1) We have constructed three new vectors for targeted integration of cloned DNA to the chromosome of *E. coli*. The *lacZ* gene being the integration locus, provides a simple white/blue selection scheme. The genetic markers are either Cm, or Km, or Gm; the plasmid marker is Ap, and *ori* is derived from pBR322 (Bolivar et al., 1977).

(2) The efficiency of the integration/selection/transduction strategy was ascertained utilizing the plasmid vectors with and without cloned genes (*Vitreoscilla* sp. hemoglobin-encoding gene and the *Photobacterium leiognathi lux* genes) in a variety of *E. coli* strains. It was found that the integration efficiencies were the same as those obtained with the plasmids without inserts.

(3) Quantification of the CAT activities produced from one or two copies of the *cat* gene in the chromosome or multiple *cat* copies contained in the pBRINT.Cm, demonstrated that CAT activity in plasmid-containing cells was not directly proportional to the copy number during the logarithmic phase.

#### REFERENCES

- Alexeyev, M.F., Shokolenko, I.N. and Croughan, T.P.: Improved antibiotic-resistance gene cassettes and omega elements for prokaryotic vector construction and in vitro deletion/insertion mutagenesis. *Gene* 160 (1995) 63-67.
- Alting-Mees, M.A., Sorge, J.A. and Short, J.M.: pBluescriptII: multifunctional cloning and mapping vectors. *Methods Enzymol.* 216 (1992) 483-495.
- Balbás, P., Alvarado, X., Bolivar, F. and Valle, F.: Plasmid pBRINT: a vector for chromosomal insertion of cloned DNA. *Gene* 136 (1993) 211-213.
- Balbás P. and Bolivar, F.: Design and construction of expression plasmid vectors in *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.* 18 (1991) 14-37.
- Bartolomé, B., Jubete, Y., Martínez, E. and de la Cruz, F.: Construction and properties of a family of pACYC-derived cloning vectors compatible with pBR322 and its derivatives. *Gene* 102 (1991) 75-78.
- Biek, D.P. and Cohen, S.N.: Identification and characterization of *recD*, a gene affecting plasmid maintenance and recombination in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 167 (1986) 594-603.

Bolivar, F., Rodriguez, R.L., Greene, P.J., Betlach, M.C., Heyneker, H.L., Boyer, H.W., Crosa, J.H. and Falkow, S.: Construction and characterization of new cloning vehicles, II. A multipurpose cloning system. *Gene* 2 (1977) 95-113.

Covarrubias, L., Cervantes, L., Covarrubias, A., Soberón, X., Vichido, I., Blanco, A., Kuperstoch-Portnoy, Y.M. and Bolivar, F.: Construction and characterization of new cloning vehicles. V. Mobilization and coding properties of pBR322 and several deletion derivatives including pBR327 and pBR328. *Gene* 13 (1981) 25-35.

Dickshit, K.L. and Webster, D.A.: Cloning, haracterization and expression of the bacterial globin gene from *Escherichia coli*. *Gene* 70 (1988) 377-386.

Diedrich, L., Ramunssen, L.J. and Messer, W.: New cloning vectors for integration into the  $\lambda$  attachment site *attB* on the *Escherichia coli* chromosome. *Plasmid* 28 (1992) 14-24.

Herrero, M., de Lorenzo, V. and Timmis, K.: Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in Gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* 172 (1990) 6557-6567.

Kallio, P., Palva, A. and Palva, I.: Enhancement of  $\alpha$ -amylase production by integrating and amplifying the  $\alpha$ -amylase gene of *Bacillus amyloliquefaciens* in the genome of *Bacillus subtilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 27 (1987) 64-71.

Neuman, J.R., Morency, C.A. and Russian, K.O.: A novel rapid assay for chloramphenicol acetyl transferase gene expression. *BioTechniques* 5(1987) 444-447.

Oden, K.L., DeVereaux, L.C., Vibat, C.R.T., Cronan Jr., J.E. and Gennis, R.B.: Genomic replacement in *Escherichia coli* K-12 using covalently closed circular plasmid. *Gene* 96 (1990) 29-36.

Pedersen, S., Bloch, P.L., Reeh, S. and Neidhardt, F.C.: Patterns of protein synthesis in *E. coli*: a catalog of the amount of 140 individual proteins at different growth rates. *Cell* 14(1978)179-190.

Pridmore, R.D.: New and versatile cloning vectors with kanamycin-resistance marker. *Gene* 56 (1987) 309-312.

Ptitsin, I.R., Gurevich, V.B., Barsanova, T.G., Shenderov, A.N., Haykinson, M.Y. and Stepanov, A.I.: Cloning and insertional mutagenesis of a DNA fragment coding for luminescent system of *Photobacterium leiognathi*. *Mol. Genet. Microbiol. Virol* (Russian). 10 (1988) 17-19.

Schweizer, H.P.: Small broad-host-range gentamycin resistance gene cassettes for site-specific insertion and deletion mutagenesis in *Escherichia coli*. *BioTechniques* 15 (1993) 831-833.

Silhavy, T.J., Berman, M.L. and Enquist, L.W.: Experiments with Gene Fusions. CSHL, Cold Spring Harbor, NY, 1984.

Verdoes, J.C., Punt, P.J. and Van der Hondel, C.A.M.J.J.: Molecular genetic strain improvement for the overproduction of fungal proteins by filamentous fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43 (1995) 195-205.

Wyman, A.R., Wolfe, L.B. and Botstein, D.: Propagation of some human DNA sequences in bacteriophage  $\lambda$  vectors requires mutant *E. coli* hosts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 (1985) 2880-2884.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Xochitl Alvarado for constructing pDUPL, Paul Gaytan, Eugenio Bustos, and Mercedes Enzaldo for their technical assistance. This work was supported by grants from Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo PNUD/MEX/93/019 and Genencor International. Inc.

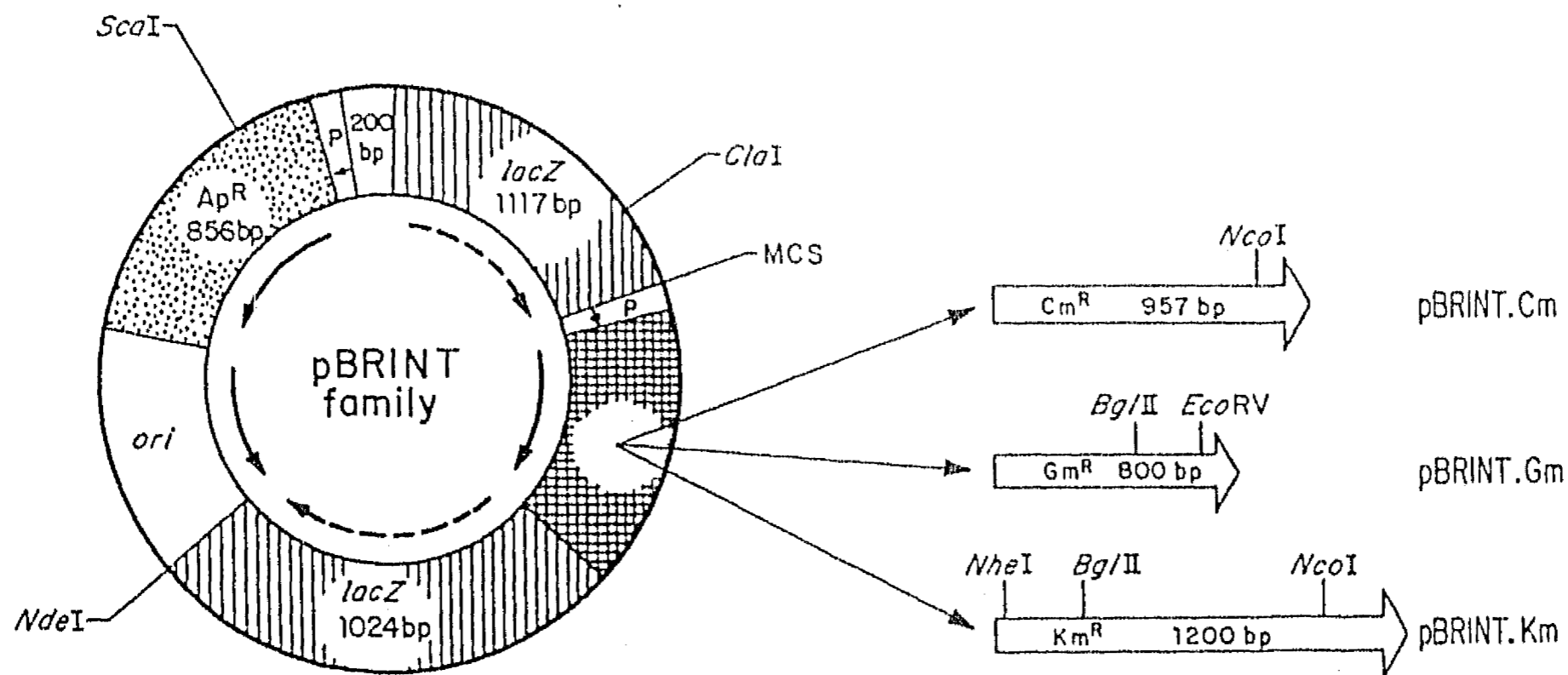
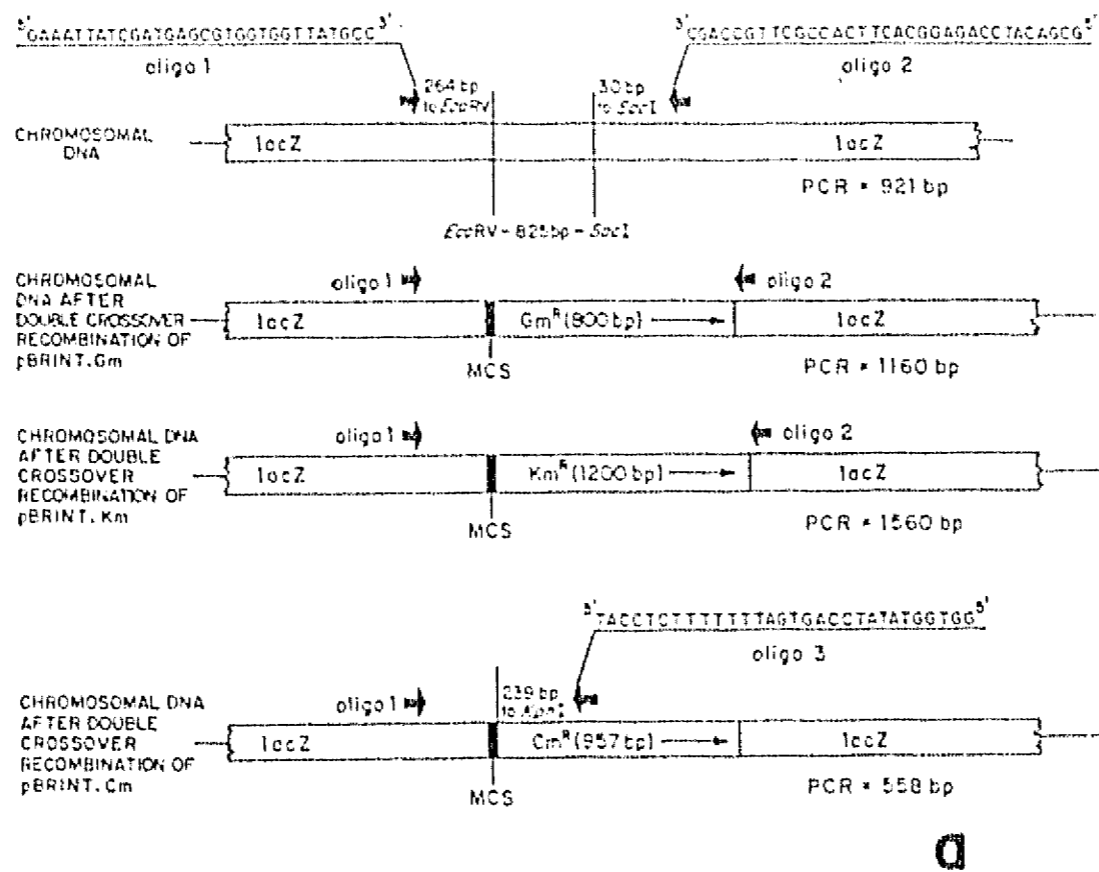
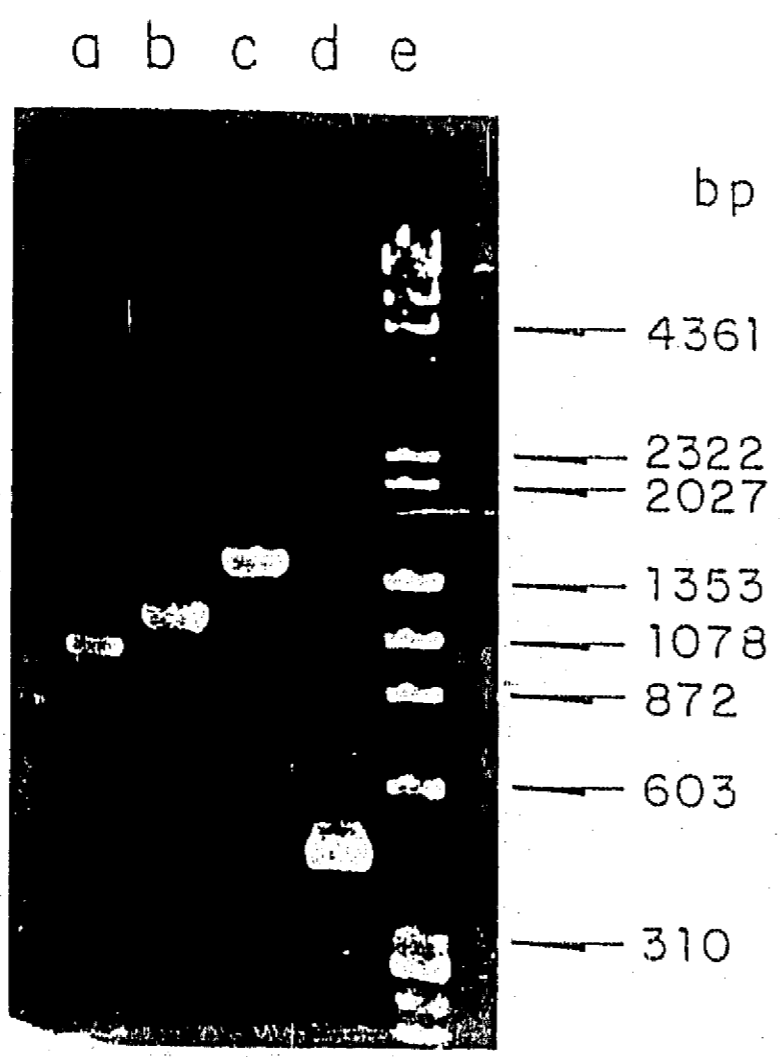


Figure 1. General structure of the pBRINT-related plasmids. Depending on the Anb-resistance marker, plasmids were named pBRINT.Cm, pBRINT.Km or pBRINT.Gm. The open arrow indicates the Anb-resistance marker ( $Cm^R$ , or  $Gm^R$  or  $Km^R$ ) that can be used to screen for the chromosomal integration of cloned DNA. The  $Cm^R$  gene (Elhai and Wolk, 1988; Bartolomé et al., 1991), the  $Gm^R$  gene (Schweizer, 1993), the  $Km^R$  gene (Pridmore, 1987), and the pBluescriptII MCS were obtained from plasmids previously reported (Alexeyev et al., 1995). The markers were cloned between the unique *EcoRV* and *Ecl136II* sites of *lacZ*. The Anb-resistance genes are oriented clockwise, except for the  $Ap^R$  gene. The cloning sites present in the MCS are: *SacII*, *NotI*, *XbaI*, *SpeI*, *BamHI*, *SmaI*, *PstI*, *EcoRI*, (*EcoRV*), *HindIII*, (*ClaI*), *Sall*, *XhoI*, *ApaI*, *KpnI*. There is an extra *ClaI* site in *lacZ*, so utilization of this site depends on the cloning strategy. In plasmid pBRINT.Gm there is a second *EcoRV* site. Constructions containing the  $Tc^R$  and the  $Sm^R$  determinants were also obtained. However they proved to be poor markers when utilized in single copy after integration into ATCC47002; therefore their usefulness for this application is restrained. The MCS is derived from pBluescriptII. The *lacZ* fragment is used for targeting sequences to integrate. The *ori* of all plasmids is derived from pBR322 (Bolivar et al., 1977). Maps are not drawn to scale. Details about the construction will be supplied upon request.



**a**



**b**

Figure 2. Strategy to characterize chromosomal recombinant strains by PCR. (A) The sequences of the oligos used as PCR primers and their positions relative to the original *EcoRV* site in *lacZ* are marked with thick arrows. The expected sizes of the PCR products are marked in the figure, and the maps are not drawn to scale. (B) Pattern of PCR-generated DNA fragments after electrophoresis in 1.2% agarose gel. Lanes: (a) JM101 wild type, (b) pBRINT.Gm, (c) pBRINT.Km, (d) pBRINT.Cm, and (e) DNA size markers ( $\lambda$  /HindIII,  $\phi$ X174/HindIII).

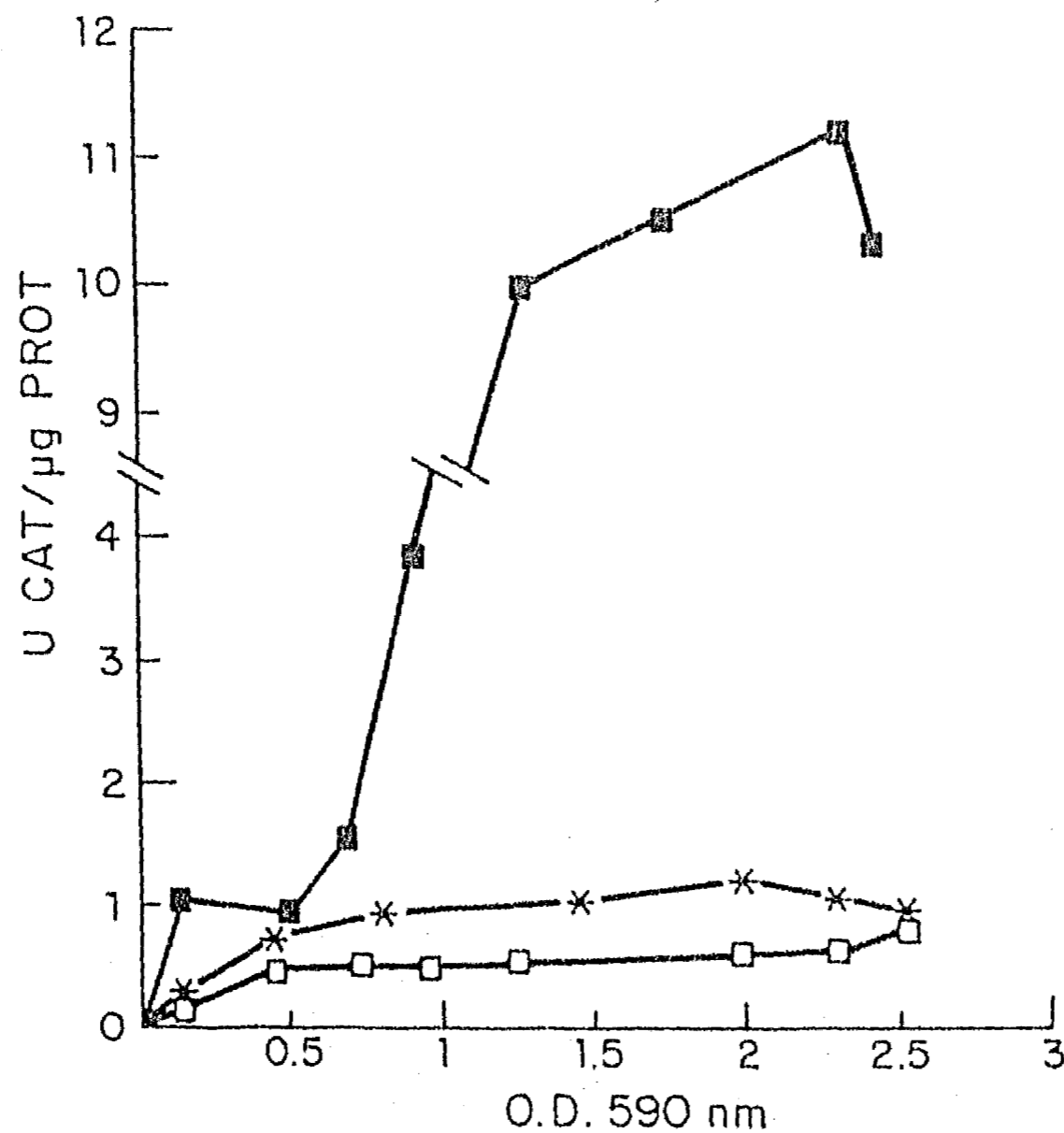


Figure 3. CAT specific enzymatic activities in *E. coli* cultures. (■) Plasmid pBRINT.Cm; (\*) JM101::DUPL, duplicated *cat* in the chromosome; and, (□) JM101::INT.Cm, one *cat* copy in the chromosome. Methods: Cultures were grown in LB medium at 37°C and 300 rpm. Samples were taken at various intervals, washed in 100 mM Tris.HCl pH 8 and frozen. Samples were resuspended in 1 ml Tris.HCl pH 8, sonicated and subjected to protein and CAT assays (Neuman et al., 1987). The quantitative CAT assay is based on the insolubility of the labelled substrate butyryl-CoA in the water-insoluble organic phase (Econofluor-2, LSD-DuPont products, Boston). Radioactivity is not detected as long as it remains in the lower aqueous layer. Upon initiation of the reaction, CAT generates labelled butyryl-Cm, which diffuses into the organic phase and is detected by scintillation counting. Purified CAT enzyme (Pharmacia) was used as standard. The reaction was stopped after 10 min by vigorous mixing. Assays were repeated twice. One unit corresponds to one nmole of [<sup>14</sup>C]butyryl-Cm formed per μg protein in 10 min.

4

INTEGRACION CROMOSOMAL  
DEL GENE QUE CODIFICA PARA  
UNA SEDA SINTETICA EN *E. coli*.

Este trabajo se realizó por encargo de la compañía Protein Polymer Technologies Inc. en La Jolla, California, por lo que parte de los resultados están restringidos para su publicación. En particular, los datos respecto a productividad de cultivos se mantienen en confidencialidad, por lo que en este trabajo se pueden presentar exclusivamente los experimentos relativos a la clonación e integración del gene en el cromosoma de *E. coli*.



## INTRODUCCION

La Biotecnología Moderna ha entrado en el área del diseño y producción de biomateriales con el objetivo de copiar polímeros protéicos naturales con características extraordinarias. Algunos ejemplos son la seda de araña, compuesta de fibras mas resistentes que el acero; fibras elásticas de los tejidos cardiovasculares de mamíferos, capaces de perdurar cien años sin perder su funcionalidad, o bien las proteínas adhesivas producidas por algunos moluscos, capaces de adherencia en condiciones de alta salinidad (Amato, 1991; Maugh y Anderson, 1992). Estos son algunos ejemplos de una gran variedad de materiales producidos a partir de proteínas con una característica en común: la de poseer secuencias conteniendo bloques cortos de aminoácidos altamente repetidos. Estos bloques de oligopéptidos pueden tener dos funciones diferentes: la de dar estructura y resistencia al material, como es el caso de las sedas naturales, la colágena y la elastina; o bien la de conferir a la proteína alguna función enzimática o de unión a otro tipo de moléculas, como en el caso de la fibronectina plasmática.

Sin embargo, el éxito de producción de estos materiales por métodos de síntesis química ha sido muy limitado, dado que la secuencia, longitud y complejidad de cualquier proteína están genéticamente determinadas por sus genes respectivos. Las técnicas de recombinación *in vitro* y síntesis química de DNA, abrieron la posibilidad no sólo de producir algunos de estos materiales a nivel industrial, sino de estudiarlos para diseñar materiales análogos con características similares o mejoradas. La mayoría de los polímeros diseñados a la fecha han sido modelados de acuerdo a fibras naturales, como seda, elastina, colágeno y el adhesivo de los moluscos. Análogos con variaciones leves en la secuencia o proporción de aminoácidos, han permitido estudios de la relación estructura-función de los bloques oligopeptídicos que componen estas proteínas, abriendo así la posibilidad de sintetizar variantes. Además, las propiedades de los polímeros sintéticos pueden alterarse por los métodos de extracción y las condiciones de procesamiento, causando variaciones en la estructura cristalina final, en las dimensiones de las cadenas, etc. Es por esto que el área de investigación sobre polímeros sintéticos ha surgido con fuerza en los últimos años, y se espera un crecimiento en el mercado de este tipo de productos.

La Compañía Protein Polymer Technologies Inc. (PPT Inc.) ha sido una de las pioneras en el campo de la producción de polímeros sintéticos para usos médicos. ProNectin™F es el nombre comercial de una proteína similar a la fibronectina y a la seda natural del gusano de seda *Bombyx mori*, que se utiliza como

recubrimiento de materiales para promover la unión de células de mamíferos en substratos sintéticos en ausencia de medio suplementado con suero. Además, este polímero es térmicamente estable, se adhiere a superficies de plástico sin desnaturalizarse, es ópticamente claro, y es insoluble en medios acuosos, por lo que se está utilizando en las áreas de cultivos de tejidos, fabricación de prótesis para uso en humanos, recubrimientos de superficies plásticas para aumentar su resistencia, etc (Capello, 1992).

Dicha compañía es líder en el campo, ya que han producido y estudiado una gran cantidad de polímeros sintéticos obtenidos a partir de fermentaciones de *E. coli*, utilizando plásmidos multicopia como vectores (Ferrari et al., 1993). Sin embargo, sus sistemas genéticos para la producción de todos sus polímeros sintéticos ha presentado dos problemas serios: la inestabilidad segregacional de sus plásmidos y la inestabilidad estructural de sus genes. El fenómeno de inestabilidad segregacional ha sido asociado a una repartición dispareja de las copias del plásmido entre las células hijas durante la división celular y se sabe que está influenciado directamente por la velocidad de crecimiento del cultivo (Balbás y Bolívar, 1990). La inestabilidad estructural de sus genes está dada por la cualidad repetitiva de la secuencia de DNA de los genes sintéticos, en los cuales se observan deleciones en los DNAs que codifican para los polímeros sintéticos.

PPT Inc. manifestó su interés en probar la integración cromosomal de uno de estos genes como una estrategia para elevar la productividad de sus fermentaciones utilizando el sistema descrito en el Capítulo 2, con la finalidad de aminorar los efectos debidos a la pérdida de plásmidos, al efecto de inestabilidad estructural o ambos. La simplicidad del sistema, así como el hecho de la integración en un sitio conocido del cromosoma, y la capacidad de seleccionar por color y por resistencia a cloranfenicol, fueron elementos esenciales que determinaron el interés en probar este sistema y no otros como una posibilidad para evitar los problemas provocados por la presencia de plásmidos multicopia en los cultivos productores de polímeros sintéticos. Así se estableció con ellos un convenio de colaboración académica en el cual se utilizaría la estrategia de integración cromosomal descrita anteriormente para integrar el gene que codifica para una seda semisintética llamada  $\beta$ -silk. Una vez obtenida una cepa de *E. coli* con la información genética en el cromosoma, en la compañía se encargarán de hacer las mediciones de productividad y compararla con la productividad de su proceso basado en plásmidos multicopia. Con esto en mente, se planteó el siguiente objetivo.

## OBJETIVO

Construir una cepa de *Escherichia coli* que contenga integrado en el gene *lacZ*, una copia del gene sintético que codifica para la proteína  $\beta$ -silk.

## GENERALIDADES

### 1. CARACTERISTICAS DEL POLIMERO SINTETICO.

Las propiedades químicas y mecánicas de las fibras tipo seda, naturales o sintéticas, dependen de la estructura y la estabilidad de los agregados formados por las proteínas que las constituyen. Estas estructuras a su vez, resultan de las preferencias conformacionales de las cadenas polipeptídicas individuales. Las proteínas tipo seda tienen una prevalencia de estructuras tipo hoja  $\beta$ -plegada, las cuales al empacarse unas sobre otras, establecen puentes de hidrógeno entre sí, formando así las estructuras fibrosas. Al igual que la proteína natural de la seda del *Bombyx mori*, las sedas semisintéticas que se obtienen a partir de *E. coli* requieren ser sometidas a un proceso mecánico de extrusión o hilatura para obtener la fibra. En caso contrario, la omisión de dichos pasos genera seda en forma soluble, sin la formación de agregados que le dan la estructura cristalina (Fossey et al., 1991). La secuencia de aminoácidos reportada por Protein Polymers Technologies de la proteína, así como la estrategia del diseño del polímero protéico, se muestran en la figura 4.1.

### 2. EL GENE QUE CODIFICA PARA $\beta$ -silk.

El gene que codifica para este polímero fue sintetizado químicamente, ensamblado in vitro y ligado en un derivado del plásmido pBR322, y tanto su secuencia como el método de ensamblaje del mismo se encuentran patentados (Ferrari et al., 1993). En vista de la elevada repetición de aminoácidos en la proteína de la seda, los tripletes utilizados para la síntesis del gene sintético fueron aquellos utilizados preferencialmente por la bacteria *E. coli*. En la figura 4.2 se muestra la estrategia general utilizada para la construcción del gene sintético. Este gene presenta elevada inestabilidad estructural precisamente por la naturaleza tan repetitiva de su secuencia nucleotídica, ya que el proceso de multimerización de los monómeros construidos produce repeticiones directas de secuencias de DNA. Estas secuencias repetidas son más estables en cepas mutantes en el gene *recA*, y aunque este genotipo mejora la estabilidad con respecto a cepas con el gene silvestre, no asegura la estabilidad estructural del gene que codifica para  $\beta$ -silk.

Bloque estructural de  $\beta$ -silk

GAGAGS

Región espaciadora de  $\beta$ -silk

GAAGY

Diseño del Bloque Básico de Aminoácidos

$(GAGAGS)_9 GAAGY$

Diseño del Monómero de la Proteína

$[(GAGAGS)_9 GAAGY]_{13}$

Esquema del Monómero de la Proteína



Esquema del Polímero de la  $\beta$ -silk

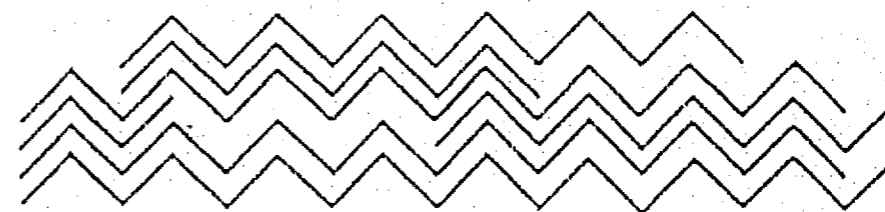
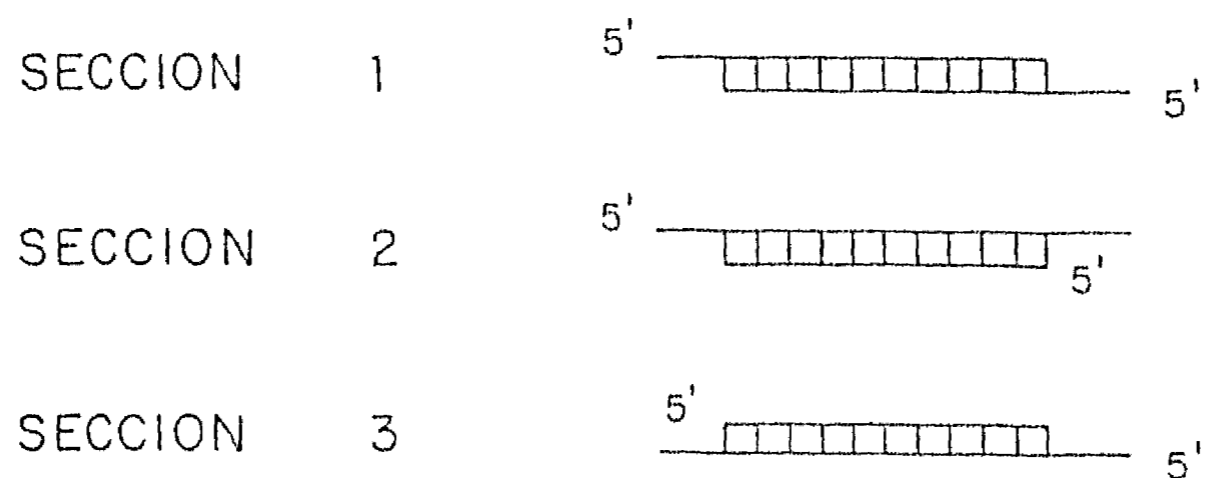
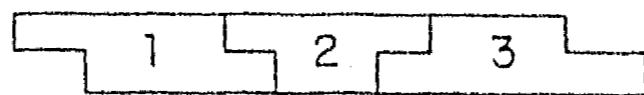


Figura 4.1. Diseño del polímero sintético a partir del cual se construyó el gene que codifica para la proteína  $\beta$ -silk. La secuencia de los 6 aminoácidos estructurales, idénticos a los que se encuentran en la seda natural del gusano *Bombyx mori*, forma los bloques primarios. Estos bloques, junto con una región espaciadora de 5 aminoácidos, forman el monómero básico, que al repetirse confiere a la proteína tanto su función como su estructura. G = glicina; A = alanina; S = serina; Y = tirosina.

## SINTESIS DE LAS SECCIONES DE DNA DE DOBLE CADENA



## ENSAMBLE DEL "MONOMERO"



## MULTIMERIZACION

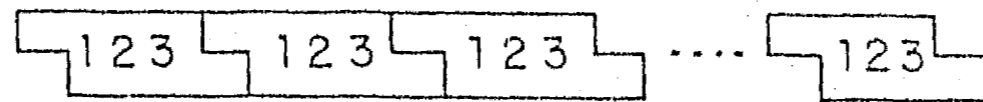


Figura 4.2. Diseño y construcción del gene sintético que codifica para la seda  $\beta$ -silk. Oligonucleótidos de DNA sintético complementarios fueron utilizados para formar tres distintos fragmentos de doble cadena de DNA conteniendo extremos salientes. Los extremos salientes de cada uno de estos fragmentos fueron diseñados de manera que al mezclar estos tres fragmentos, los extremos hibridaran de forma ordenada sin ambigüedad para formar los monómeros estructurales de la proteína. Posteriormente, mediante la multimerización de estos monómeros por la enzima ligasa del DNA, se generaron fragmentos de tamaños variables con secuencia repetida (Ferrari et al., 1993). Se aislaron los fragmentos de mayor tamaño y se procedió a ligarlos en un plásmido derivado del pBR322. Se seleccionaron varias clonas y a nuestro laboratorio mandaron un gene de aproximadamente 3,432 pb.

### 3. EL VECTOR QUE CONTIENE AL GENE QUE CODIFICA PARA $\beta$ -silk.

En el vector denominado pSY1008 se encuentra clonado el gene de la seda. Dicho plásmido contiene el origen de replicación del pBR322, ya que la utilización de orígenes que confieren un número de copias mayor (por ejemplo pUC19 y derivados) incrementan significativamente la velocidad de pérdida del gene (presumiblemente por deleción) (Ferrari F., comunicación personal). Dos genes de resistencia están presentes en el vector original: el gene que codifica para  $\beta$ -lactamasa de *E. coli*, y el gene que codifica para la transacetilasa de cloranfenicol de *Bacillus subtilis*. En cuanto a la clonación del gene de la seda, es importante resaltar que el vector mismo provee al gene sintético con señales de inicio y terminación de la transcripción, según se presenta en la figura 4.3. El promotor  $P_R$ , del bacteriófago  $\lambda$ , dirige la síntesis de la proteína de la seda como una proteína híbrida, ya que contiene un codón de inicio de la traducción (ATG), 29 aminoácidos de *lacZ* (del aminoácido número 8 al 35 de  $\beta$ -galactosidasa) y 17 aminoácidos correspondientes al carboxilo terminal de  $\beta$ -galactosidasa. Este promotor es regulado por el represor termosensible del bacteriófago  $\lambda$ ,  $cI_{859}$ , que se encuentra clonado en el mismo plásmido. De aquí que la transcripción del gene se mantenga reprimida a 28°C y pueda inducirse a 37°C para lograr obtener elevados niveles de expresión (Ferrari et al., 1993).

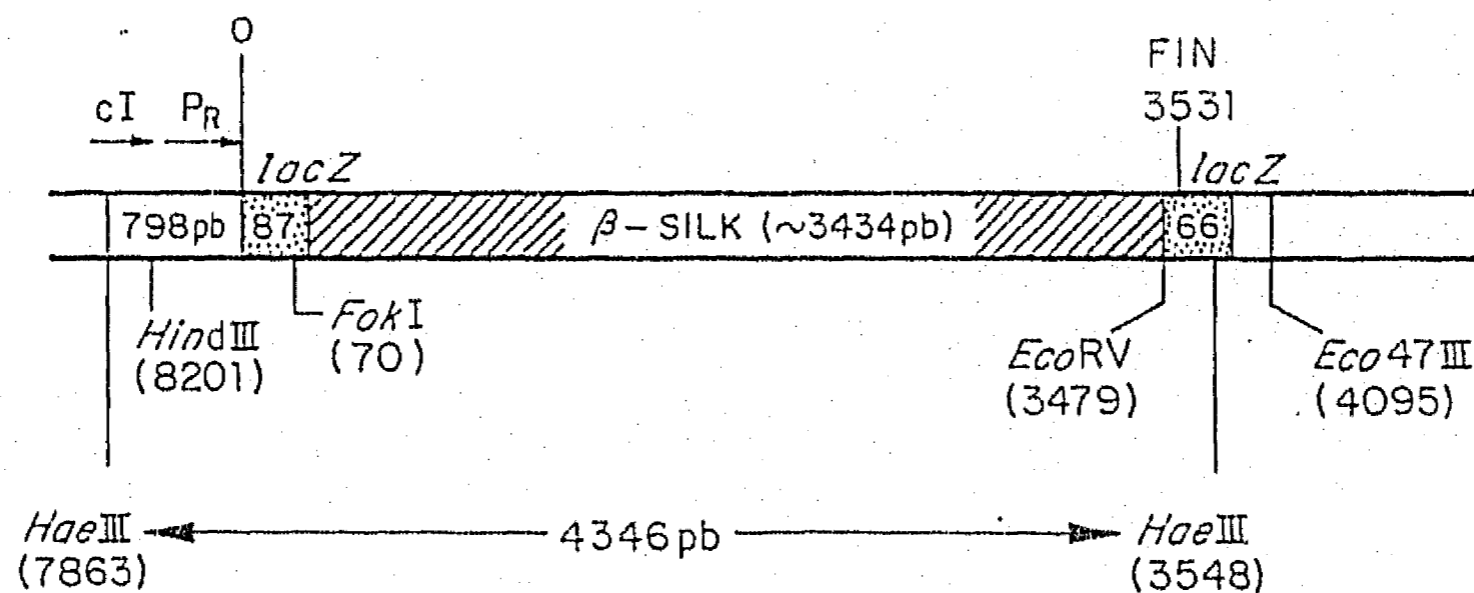


Figura 4.3. Esquema de la estructura del gene que codifica para  $\beta$ -silk y sus regiones reguladoras contenidas en el plásmido pSY1008. El dibujo no está hecho a escala.

#### 4. LA CEPA DE PRODUCCION DEL POLIMERO PROTEICO.

El genotipo indispensable para disminuir la inestabilidad estructural del gene sintético es, como ya se dijo anteriormente, *recA*. La cepa que se nos proporcionó fue la MM294 ( $F'$ , *supE44*, *hsdR17*, *mcrA,B*, *endA1*, *thi-1*,  $\lambda$ ; Talmadge y Gilbert, 1980) convertida a *recA* en la compañía. Como puede observarse, esta cepa tiene el gene de *lacZ* intacto, por lo que el esquema de selección por color debe funcionar al igual que en las cepas descritas en los capítulos 2 y 3. Sin embargo, el hecho de poseer el genotipo *recA*; producirá una disminución de la eficiencia de transducción con el bacteriófago P1 alrededor de  $10^3$  veces (Porter, 1988).

#### 5. CONDICIONES DE CULTIVO.

La condición mas relevante para el cultivo de las cepas conteniendo el vector pSY1008 es la temperatura, que debe mantenerse por debajo de 30°C para evitar la inducción del promotor termosensible  $P_R$ . No existen otras restricciones condicionadas por el sistema genético.

### RESULTADOS Y DISCUSION

#### 1. Clonación del gene que codifica para $\beta$ -silk en uno de los plásmidos de integración.

Se llevaron a cabo muchos esfuerzos para clonar el gene sintético en el pBRINT (Balbás et al., 1993), y una vez que estuvieron construidos los vectores mejorados, también en éstos se llevaron a cabo varios intentos de clonación del gene sintético. Finalmente, la estrategia con la que se tuvo éxito en la clonación del gene de  $\beta$ -silk fue en el plásmido pBRINT.Gm, y se muestra en la figura 4.4.

De varios experimentos se obtuvieron colonias conteniendo plásmidos recombinantes con insertos de varios tamaños. En la figura 4.5 se muestran los patrones de restricción de los plásmidos obtenidos, y en la Tabla 2 se resume el número de colonias obtenidas de cada tamaño de inserto.

Tabla 2. Cuantificación de las colonias obtenidas al clonar el fragmento de DNA conteniendo el gene que codifica para  $\beta$ -silk en pBRINT.Gm.

PLASMIDO	TAMAÑO DEL INSERTO	NUMERO DE COLONIAS
pS4000	4000 pb	1
pS2300	2350 pb	2
pS1900	1900 pb	6
pS1300	1300 pb	1
p-1300	menos de 1300 pb	4

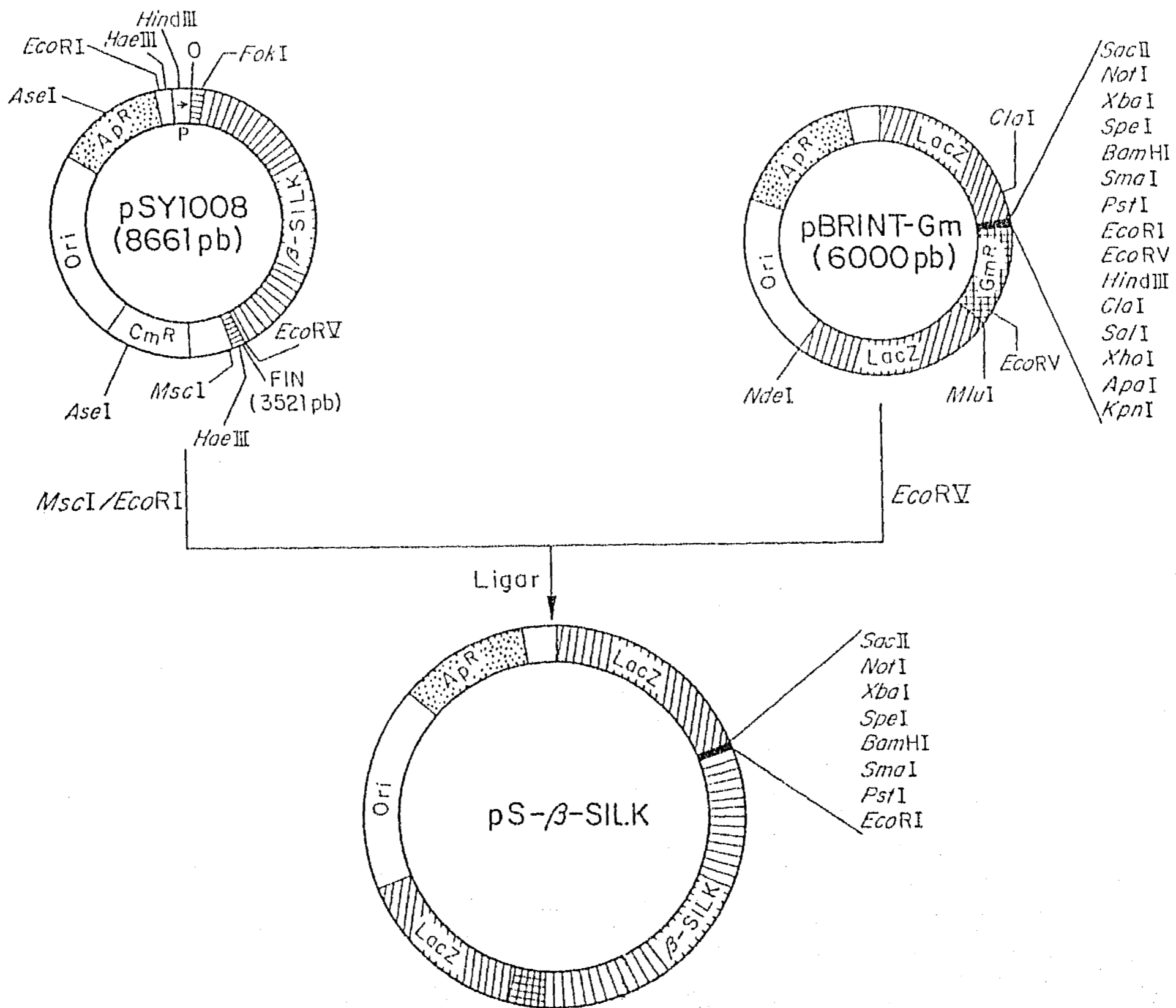


Figura 4.4. Esquema de la clonación del gene de la seda en el derivado pBRINT.Gm. El plásmido pSY1008 fue digerido con las enzimas *AseI*-*MscI*-*EcoRI* con el fin de aislar el gene de  $\beta$ -silk contenido en un fragmento de aprox. 4,714 pb (*EcoRI*-*MscI*). El vector fue digerido a su vez con *EcoRI* y *EcoRV*, sitios incompatibles entre sí, pero compatibles con los extremos del fragmento, por lo que se esperaba la clonación direccional del fragmento de DNA conteniendo el gene. Vector e inserto fueron mezclados en proporciones 1:1 y 1:2, y transformados en células competentes preparadas de MM294 *recA*<sup>+</sup>, provista por PPT Inc. La selección de colonias transformantes se llevó a cabo en cajas de LB con 100  $\mu$ g/ml de Ap, y posteriormente se repicaron en cajas con 15  $\mu$ g/ml de gentamicina (Garamicina, Schering-Plough de México). Este esquema de selección indirecta, permitió aislar varias colonias Ap<sup>r</sup>-Gm<sup>s</sup>, indicando así la pérdida del fragmento interno del gene que codifica para la gentamicina acetyltransferasa 3-1 (*aacC1*) y la inserción de un fragmento de DNA.



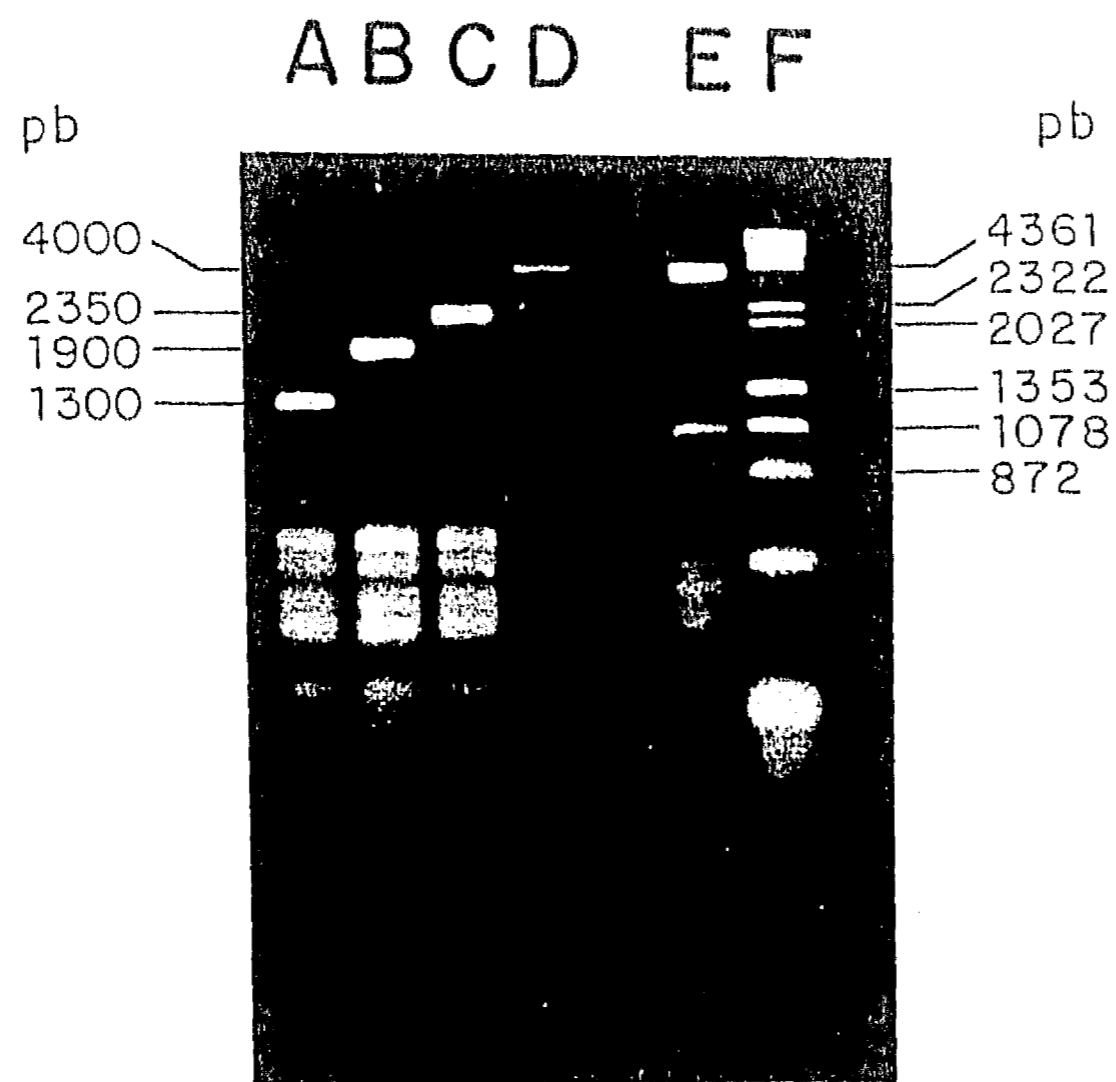


Figura 4.5. Fotografía de un patrón de restricción de los plásmidos recombinantes digeridos con la enzima *Hae*III y analizados en un gel de agarosa al 2%. Carril A: pS1300; Carril B: pS1900; Carril C: pS2350; Carril D: pS4000; Carril E: pSY1008, y Carril F:  $\lambda$ /HindIII, cX174/HindIII, marcadores de tamaño.

Se observa que tanto en los tamaños de los insertos, como en el número de colonias obtenidas se presentan variaciones considerables. Este fenómeno era de esperarse debido a la naturaleza altamente repetitiva de la secuencia nucleotídica, ya que la presencia de secuencias repetidas directas favorece los rearrreglos del material genético. Es interesante observar que los tamaños de los insertos obtenidos varían en múltiplos de aproximadamente 150 pb, ya que el bloque básico de aminoácidos presentado en la Figura 4.1 tiene exactamente ese tamaño,

lo que sugiere que la pérdida puede ser por bloques. Sin embargo, esta suposición quedó sin comprobar, ya que habría que secuenciar estos insertos en su totalidad con el fin de verificar la validez de dicho comentario. Además, dado que la compañía se reservó el derecho de comprobar la capacidad para la producción de la seda semi-sintética a partir de cualquier construcción genética lograda por nuestro grupo, este punto será evaluado indirectamente por PPT Inc., una vez que las construcciones sean integradas en el cromosoma de *E. coli*.

La pregunta primordial en este punto era saber si los insertos obtenidos habían sufrido pérdidas internas, o bien si estas deleciones eliminaban los extremos carboxilo y amino terminales del gene híbrido. Para esto, se digirió el DNA de cada uno de los plásmidos obtenidos con dos enzimas de restricción que cortan muy cerca del extremo del gene: *EcoRV* y *HindIII* (figura 4.3). Estos sitios se encontraron presentes en todos estos derivados, lo que sugirió fuertemente que las deleciones observadas sucedieron dentro del gene que codifica para  $\beta$ -silk (datos no mostrados).

En este punto se encontró un fenómeno interesante: al purificar más DNA del plásmido pS4000 se observó la pérdida del fragmento correspondiente al gene de la seda y se obtuvo un fragmento de 1,900 pb en lugar de los 4,000 pb esperados, por el solo hecho de cultivar las células 12 hrs a 28°C. Esto sugirió fuertemente, que el tamaño más estable del gene que codifica para la  $\beta$ -silk, al ser clonado en pBRINT.Gm, es precisamente de 1,900 pb, lo que concuerda con los resultados obtenidos de la frecuencia de aparición de las clonas pS1900 presentadas en la Tabla 1.

## 2. Clonación del gene de Km<sup>R</sup> en los plásmidos pS2300 y pS1900.

Los plásmidos obtenidos no cuentan con un gene de selección adecuado para el seguimiento del proceso de integración, por lo que se procedió a clonar el gene de resistencia a Km en el sitio de *EcoRI* en los plásmidos pS2300 y pS1900. La mezcla de ligado fue transformada en MM294 *recA*, y las colonias seleccionadas en 20  $\mu$ g/ml de Km (Kantrex, Bristol Labs.). Se obtuvieron 100 colonias y solamente se analizaron 10 de cada uno de los plásmidos. Todas las colonias presentaron insertos del gene de Km, como era de esperarse. Los 10 plásmidos pS1900Km analizados, presentaron también el patrón de restricción esperado después de ser digeridos con la enzima *HaeIII*. Sin embargo, de los 10 plásmidos pS2300Km, el fragmento de 2,350 pb presentó deleciones considerables: seis presentaron un fragmento de 1,900 pb y los otros 4 plásmidos presentaron fragmentos de 1,300 pb (datos no mostrados).

Estos resultados apoyan la hipótesis de la pérdida selectiva de fragmentos internos del gene sintético, ya que por el solo hecho de manipular el plásmido, el fragmento de *HaeIII* correspondiente al gene de la seda disminuye de tamaño. El hecho de que a partir de un plásmido, con un fragmento de *HaeIII* de 2,350 pb se generen nuevamente plásmidos con fragmentos de *HaeIII* de tamaño igual al observado cuando se hizo la clonación original del gene (1,300 y 1,900 pb respectivamente), sugieren fuertemente que estos tamaños son más estables.

En el plásmido pS1900Km, se confirmó la presencia de los sitios *HindIII* y *EcoRV* en los extremos respectivos del gene de la seda. Una vez determinada su presencia, se procedió a hacer la integración cromosomal de la cepa ATCC47002.

### 3. Integración del gene de $\beta$ -silk en el cromosoma de la cepa ATCC47002.

El plásmido pS1900Km fue transformado en células competentes de ATCC47002 por métodos tradicionales, y la mezcla de transformación fue plateada en cajas de LB con IPTG, XGal y 7.5  $\mu$ g/ml de Km. Se obtuvieron 6 colonias blancas, resistentes al antibiótico, a partir de las cuales se preparó DNA cromosomal con el fin de verificar la integración por doble recombinación homóloga mediante la técnica de Southern no radiactivo (DuPont NEN).

Se encontró que en 4 de las 6 colonias había una banda de hibridación con el tamaño esperado, tal y como se muestra en la figura 4.6. Estos resultados sugieren que las dos colonias que no presentaron señal de hibridación perdieron el fragmento de DNA que contiene el gene de la seda, por lo que se planteó la necesidad de confirmar la estabilidad del DNA integrado en las colonias con señal positiva. Asimismo, se tomó al azar una de estas cuatro colonias positivas y se procedió a llevar a cabo la transducción de su DNA cromosomal a la cepa MM294 *recA*:

### 4. Transducción del DNA cromosomal de ATCC47002 conteniendo el gene de $\beta$ -silk a la cepa MM294 *recA*:

Una de las colonias que mostraron tener el gene de  $\beta$ -silk integrado en el cromosoma, se seleccionó para preparar un lisado de bacteriófago P1 con el fin de transducir el gene de la seda a varias cepas. Una vez cuantificado el número de fagos presentes en el lisado, se procedió a infectar varias cepas con diversas concentraciones de fago. El proceso de transducción requiere una variedad de vías enzimáticas alternativas, y la enzima RecA juega un papel importante. Se sabe que el fenotipo *recA* en *E. coli* tiene además un efecto notorio sobre la transducción

del bacteriófago P1, disminuyendo su eficiencia alrededor de  $10^3$  veces (Porter, 1988). Con el fin de verificar dicho dato, se utilizaron otras cepas como controles positivo y negativo respectivamente. De las colonias obtenidas, se preparó DNA cromosomal que fue posteriormente analizado en transferencia tipo Southern tipo no radiactivo, usando como sonda rastreadora el mismo fragmento descrito en la figura 4.6. Los resultados tanto de las eficiencias de transducción, como de los Southernns se presentan en la Tabla 3.

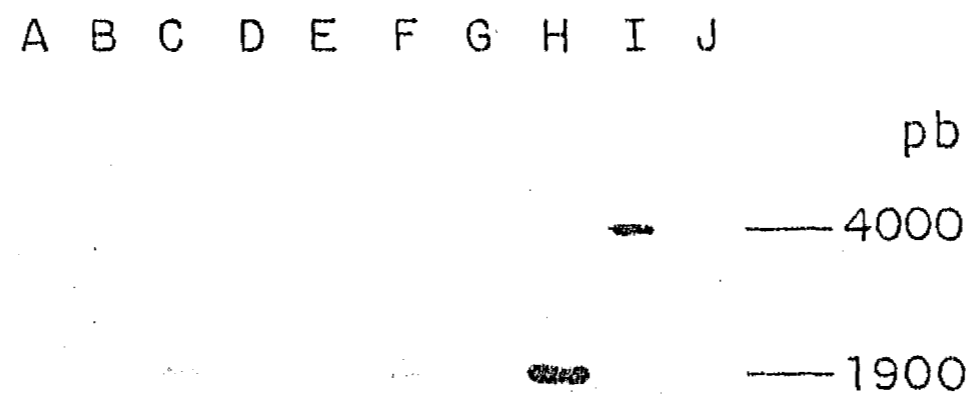


Figura 4.6. Autorradiografía de un gel de DNA cromosomal de ATCC47002 con el gene de la seda integrado en su cromosoma detectado por transferencia tipo Southern. El DNA cromosomal aislado de cada colonia se digirió toda la noche con la enzima *Hae*III y se separaron los fragmentos por electroforesis en un gel de agarosa al 2%. Este DNA fue transferido a una membrana de Nytran, fijado y prehibridado con DNA de timo de ternera, según las indicaciones del fabricante. Como sonda rastreadora se utilizó el fragmento de *FokI-EcoRV* (Fig. 4.3) correspondiente al gene de la seda. Este fragmento de DNA fue marcado con fluoresceína, hibridado contra la membrana de Nytrán con las muestras y posteriormente revelado con anticuerpos específicos para llevar a cabo la detección de los fragmentos de DNA contra los cuales hibrida dicha sonda. Carril A: DNA cromosomal de la cepa silvestre de ATCC47002 digerido con *Hae*III; Carril B al G, DNA de las colonias de ATCC47002 con el posible inserto de  $\beta$ -silk en el gene *lacZ*, digerido con *Hae*III; Carril H, plásmido pS1900 digerido con *Hae*III; Carril I, plásmido pSY1008 digerido con *Hae*III; Carril J: DNA del bacteriófago  $\lambda$  digerido con *Bst*EII.

Tabla 3. Resultados obtenidos de la transducción de las cepas receptoras con el lisado de fagos P1.

CEPA	COLONIAS TOTALES <sup>a</sup>	COLONIAS POSITIVAS <sup>b</sup>	TAMAÑO DEL INSERTO
MM294 <i>recA</i> <sup>-</sup>	16	3	1,900 pb
JM109 <i>recA</i> <sup>-</sup>	0	0	ND
JM101	200	ND <sup>c</sup>	ND

<sup>a</sup>, fenotípicamente blancas, Km<sup>R</sup>

<sup>b</sup>, con inserto corroborado por Southern no radiactivo.

<sup>c</sup>, el gene de  $\beta$ -silk es inestable en esta cepa por ser *recA*<sup>-</sup>

ND, No Determinado.

Estos resultados indicaron que la eficiencia de transducción e integración de la cepa MM294 *recA*<sup>-</sup>, se encontraban muy por arriba de lo esperado. Las cepas control tienen el mismo fondo genético (JM109 es derivada *recA*<sup>-</sup> de JM101) (Yanisch-Perron et al., 1985) y en éstas se observa una clara diferencia en la eficiencia de transducción utilizando una misma concentración de fagos. Sin embargo, al cambiar a la cepa provista por PPT Inc., se observó una frecuencia de transducción intermedia a la que se obtuvo con las cepas control. Este experimento fue repetido varias veces y los resultados fueron similares, descartándose así la probabilidad de contaminación por otra cepa. Estos resultados por tanto sugieren que la cepa MM294 no presenta un genotipo *recA*<sup>-</sup> típico en lo que se refiere a la eficiencia de transducción por P1. Cabe mencionar que esta cepa fue construida en PPT Inc. de manera no específica, por lo que puede haber otras mutaciones no descritas que estén modificando el comportamiento típico de las mutaciones en *recA*.

En lo que se refiere al tamaño del inserto determinado por el método de Southern, solamente 3 de las 16 colonias obtenidas presentaron inserto, y además, la señal de hibridización fue muy leve en comparación con las señales obtenidas de los controles (datos no mostrados). Ambas observaciones, sugirieron que el fragmento de 1,900 pb se estaba perdiendo del DNA cromosomal de las colonias obtenidas. Las 3 colonias positivas fueron cultivadas de nuevo, se aisló mas DNA cromosomal, y nuevamente se hizo el análisis por Southern de los DNAs digeridos con *HaeIII*. De estos nuevos cultivos, ya ninguno presentó hibridización, lo que corroboró la hipótesis de que el fragmento de interés es altamente inestable aún en monocopia integrado en el cromosoma de la cepa MM294 *recA*<sup>-</sup>. En todos los

experimentos se utilizó como control DNA cromosomal de la cepa ATCC47002::1900Km, tratado igual que las colonias problema. Esta cepa siempre presentó señal positiva de hibridización, con una intensidad constante y solamente algunas veces se observaron productos de hibridización de tamaño menor a 1,900 pb. La cepa ATCC47002 con la integración del gene de la seda y Km<sup>R</sup> fue sembrada y cultivada varias veces a lo largo del desarrollo de los experimentos y se observó la constancia en el patrón positivo y constante de hibridización. En ATCC47002, el gene que codifica para  $\beta$ -silk fue estable al menos para permitir cuatro subcultivos a 29°C.

#### CONCLUSIONES

1. Se construyeron cinco derivados del pBRINT.Gm conteniendo fragmentos de diferentes tamaños del gene que codifica para la  $\beta$ -silk. Uno de estos, el de 1,900 pb es aparentemente el más estable, y con este derivado se probó el esquema de integración y transducción planteado en los capítulos 2 y 3.
2. Se logró el objetivo planteado de integrar y estabilizar el gene sintético en el cromosoma de *E. coli* ATCC47002. Si bien esta cepa no es la cepa de producción de PPT Inc., los problemas de pérdida interna del gene se manifiestan notoriamente en MM294 *recA*; por lo que la compañía está dispuesta a probar la eficiencia de la cepa construida en este trabajo.

# 5

## DISCUSION GENERAL

En este capítulo se presenta un análisis global de los resultados obtenidos, la eficiencia del sistema y se plantean algunas perspectivas acerca del desarrollo futuro de esta línea de investigación.

La transferencia de genes mediante la integración de DNA al cromosoma de organismos, tanto procariotes como eucariotes, ha expandido grandemente el potencial de realizar análisis genéticos. La modificación del DNA cromosomal se ha perfilado como una herramienta altamente poderosa para introducir o remover genes de los cromosomas, para el estudio de la estructura del genoma, para la construcción de cepas transgénicas mediante la modificación dirigida de genes y para la construcción de microorganismos seguros para su liberación al medio ambiente. Es precisamente en este contexto de la modificación de organismos, que las técnicas de integración dirigida de genes en el cromosoma cobran una gran importancia, ya que mientras mejor se conozcan los mecanismos de recombinación y movilización de genes para lograr la alteración in vivo de organismos, se lograrán avances significativos en el área de alteración génica, ya sea con fines terapéuticos, productivos, ecológicos, etc.

En este trabajo se presento el diseño, construcción y validación de una serie de plásmidos derivados del pBR322, como vectores para permitir la integración cromosomal de DNA clonado en *E. coli*. Varios genes fueron utilizados, y en todos los casos se obtuvo éxito en el proceso de integración cromosomal en la cepa ATCC47002 y la transducción de los mismos a otras cepas (Capítulos 2 y 3).

Si bien es claro que ningún sistema de integración cromosomal tiene la cualidad de tener una utilidad universal, el sistema desarrollado tiene varias ventajas, aunque la significancia de éstas dependerá del método alternativo con el que se compare y el objetivo final del experimento. En términos generales, se consideran como ventajas claras las siguientes:

1. La simplicidad de los métodos, ya que se utiliza DNA circular covalentemente cerrado para transformar *E. coli* por métodos tradicionales, sistemas de selección ampliamente conocidos, y métodos genéticos comunes de transducción.
2. La integración cromosomal es en un gene conocido, lo que evita problemas de ambigüedad respecto a la configuración resultante en el cromosoma y número de copias del inserto.
3. La inactivación de *lacZ*, que permite un sistema de selección directa por color.
4. La selección y el seguimiento de las construcciones obtenidas por clonación, al transferir el DNA cromosomal entre cepas gracias a la presencia de un gene de resistencia a antibiótico.
5. La eficiencia de integración de los vectores en ATCC47002 (fenotipo hiper-recombinante), que es suficiente para lograr el éxito en un solo experimento de transformación, utilizando 1 ng de DNA de plásmido.



6. El método de análisis de DNA cromosomal para validar la integración cromosomal, que está basado exclusivamente en el tamaño de un producto obtenido por PCR, elimina la necesidad de usar métodos de hibridación con sondas específicas. Además, los oligonucleótidos sintéticos que se utilizan en el PCR son universales, ya que hibridan con *lacZ*, por lo que son útiles indistintamente del gene que se haya clonado.

Aunque estas características hacen del sistema un buen candidato para la integración sencilla de cualquier gene (incluyendo genes inestables con secuencias repetidas directas), pueden argumentarse algunas limitaciones inherentes a este diseño específico. Uno es que permite una sola integración en *lacZ*, por lo que integraciones subsecuentes deberán ser en otros loci. En este caso el esquema global funciona adecuadamente, pero los vectores como tales serían inadecuados, por lo que habría que cambiar los fragmentos de *lacZ* por fragmentos del gene en cuestión, y es posible que las eficiencias de integración y de transducción no sean las mismas para todos los genes. Alternativamente, habría que clonar el gene de resistencia junto con los sitios de restricción dentro del gene previamente clonado. Siguiendo en esta línea de integraciones múltiples de genes, los genes de resistencia a antibióticos son solamente tres, y al ser integrados uno a uno se tendría un cromosoma con múltiples resistencias a antibióticos, por lo que habría que buscar otros marcadores de selección, o bien la forma de removerlos del cromosoma a posteriori.

En el Capítulo 3 se presentó un análisis sobre los niveles obtenidos de actividad enzimática de CAT, la cual inactiva al antibiótico cloranfenicol mediante la transferencia del grupo acetilo de la acetil coenzima A. En este estudio se demostró que los niveles de producción de actividad enzimática obtenidos de cepas con integración cromosomal (una y dos copias) presentan un patrón distinto al obtenido a partir de cultivos con plásmido, observándose una respuesta lineal de actividad obtenida con respecto a la dosis génica. Estos resultados pueden variar al tener los genes en plásmidos multicopia, ya que se introduce en el sistema la variante de la inestabilidad de plásmido y/o la variación del número de copias dependiente de la velocidad de crecimiento del cultivo. A partir de la discusión presentada en el artículo, podemos asumir que al eliminar los problemas de inestabilidad de plásmidos, los niveles de producción de actividad enzimática obtenidos a partir de un gene en monocopia en el cromosoma serán claramente predecibles, siempre y cuando no exista inestabilidad estructural inherente al gene.

Las ventajas de tener un gene en monocopia establemente integrado en el cromosoma, versus el mismo gene clonado en un plásmido multicopia, para el estudio de la regulación de su expresión son muy claras, ya que se evitan problemas inherentes a la elevada dosis génica, a la titulación de moléculas efectoras, y a efectos debidos a una elevada concentración del producto protéico, por lo que la interpretación de resultados pudiera ser mas clara.

En el caso de la sobreproducción de proteínas, si bien la primera opción es siempre la utilización de sistemas de expresión a partir de plásmidos multicopia, en caso de surgir algún problema a nivel de producción, se propone, a partir de los resultados obtenidos en este trabajo, que este sistema pueda emplearse también en el área de producción de proteínas, especialmente en los siguientes casos: (i) cuando se requiera disminuir los niveles basales de transcripción del gene de interés, sobre todo si su producto afecta el desarrollo de los cultivos; y (ii) si existe inestabilidad segregacional del plásmido, ya que la integración estable permite llevar a cabo fermentaciones más largas. Un promotor fuerte y regulable puede servir para elevar los niveles de expresión de genes en monocopia, ya sea que dichos promotores sean parte del vector de integración en sí o que estén previamente ligados al gene que se desea expresar.

Los genes naturales que se utilizaron para la validación del sistema descrito, fueron exitosamente integrados en ATCC47002 y transferidos por transducción con P1 a diversas cepas. Sin embargo, en el Capítulo 4 se describen los estudios realizados con un gene sintético que codifica para el polímero de  $\beta$ -silk, que nos permitieron detectar una diferencia en la estabilidad de las secuencias repetidas en dos cepas con genotipos distintos, sugiriendo que alguna de las mutaciones presentes en ATCC47002 pudiera favorecer la estabilidad del gene sintético.

Las mutaciones *recB21* y *recC22* inactivan la exonucleasa V, RecBCD, la cual degrada DNA lineal de cadena doble o sencilla mediante la utilización de ATP, y a su vez juega un papel central en las vías de reparación de DNA de doble cadena. RecBCD interacciona con la secuencia conocida como *chi* ( $\chi$ ), un octanucleótido asimétrico conocido como sitio de hiper-recombinación (Kuzimov et al., 1994). El modelo mas aceptado sugiere que cuando la enzima RecBCD está actuando como ExoV de doble cadena y encuentra un sitio *chi* correctamente orientado, su actividad de exonucleasa es temporalmente inactivada por pausamiento de la enzima, y esto favorece que la nucleasa tenga entonces función de recombinasa, promoviendo la recombinación entre sitios *chi*. El hecho de no tener esta actividad en nuestra cepa permite transformar tanto con DNA lineal como superenrollado, lo cual es una ventaja, ya que el esquema descrito puede usarse con DNA

proveniente de PCR, o plásmido lineal (Oden et al., 1990). Además el fenómeno de concatamerización de plásmidos en el momento de la replicación, favorece que se pierdan de los cultivos por segregación, y por ende la selección de colonias con el marcador de selección integrado (Biek y Cohen, 1986). Mutantes exclusivamente en *RecBCD* tienen fenotipos hipo-recombinantes, y fue precisamente mediante el aislamiento de mutantes supresoras de este fenotipo que se aislaron y caracterizaron mutantes hiper-recombinantes, que incluyen mutaciones en varios loci, a saber, *sbcA*, *sbcB* y *sbcC*. La combinación de mutaciones en *recBC* y en *sbcB* actúan presumiblemente activando la vía de recombinación en los sitios *chi*, asistida por *RecA* y *RecF*, pero el mecanismo por el cual el fenotipo observado es hiper-recombinante no es claro (Zaman y Boles, 1994). Dado que el gene sintético no tiene sitios *chi*, se sugiere que la estabilidad estructural del gene integrado está dada precisamente por el fenotipo *recBCD*, *sbcB*.

Sin embargo, el hecho de que al llevar a cabo la integración del gene de  $\beta$ -silk en el cromosoma de ATCC47002 se observe la misma eficiencia que para los vectores con genes naturales, sugiere que el evento de la inestabilidad del plásmido es un problema independiente de la estabilidad estructural del gene en sí. La presencia del gene sintético en plásmidos multicopia puede favorecer los rearrreglos genéticos intermoleculares que tengan como consecuencia la pérdida del plásmido. Además, puede existir un efecto por dosis génica en cuanto a un nivel basal de transcripción de escape, superior al que se tenga a partir de una copia integrada en el cromosoma.

Se sugiere la cuantificación de la proteína sintética producida a partir de la cepa construida en nuestro laboratorio, con el fin de compararla con la cepa de producción con la que actualmente se ha trabajado en PPT Inc. La valoración de la eficiencia de nuestra cepa puede llevarse a cabo comparando los niveles de producción de fermentaciones de la cepa productora, con respecto a la nueva cepa. La pregunta será si el hecho de tener una copia del gene establemente integrada en el cromosoma, y con un menor nivel basal de transcripción de escape, es suficiente para contrarrestar los efectos causados por la inestabilidad del plásmido multicopia y la intoxicación de los cultivos por los niveles basales de producción de la proteína sintética.

En resumen, el presente trabajo forma parte de un esfuerzo de nuestro laboratorio para responder a necesidades específicas en el área de la biología molecular de *E. coli*. Los vehículos moleculares construidos y los procedimientos aquí reportados podrán ser utilizados para diversas áreas de investigación básica y aplicada, ofreciendo así una nueva opción para el diseño de experimentos.

## REFERENCIAS

Amato, I.: Heeding the call of the wild. *Science* 253:967-968 (1991)

Balbas, P., Soberon, X., Valle, F., Merino, E., Zurita, M., Lomeli, H., Flores, N. and Bolivar, F.: Plasmid vector pBR322 and its special purpose derivatives: a review. *Gene* 50: 3-40 (1986)

Balbás, P., Soberón, X., Bolivar, F. and Rodriguez, R.L.: The plasmid pBR322. In *Vectors: a survey of molecular cloning vectors and their uses.* (R.L. Rodriguez and D.T. Denhardt, eds.) Butterworths, Stoneham, MA, pp 5-41 (1988)

Balbás, P. and Bolivar, F.: Design and construction of expression plasmid vectors in *E. coli*. *Meth. Enzymol.* 185:14-37 (1990)

Balbás, P.: Expression from plasmid vectors in *E. coli*. In *Methods in Molecular Biology Series. Expression and Detection of Recombinant Genes*, Tuan, R.S. and Walker, H.J. eds., Plenum Press, USA, en prensa (1996)

Balbás, P. and Bolivar, F.: Molecular cloning by plasmid vectors. In: *Foundations of DNA Methodology* (J.J. Greene and V. Rao, Eds.) Marcel Dekker Inc., New York, NY, en prensa (1996)

Berinstein, N., Pennell, N., Ottaway, C.A. and Shulman, M.J.: Gene replacement with one sided homologous recombination. *Mol. Cell. Biol.* 12: 360-367 (1992)

Biek, D.P. and Cohen, S.N.: Identification and characterization of *recD*, a gene affecting plasmid maintenance and recombination in *E. coli*. *J. Bacteriol.* 167:594-603 (1986)

Blum, P., Holzschu, D., Kwan, H.S., Riggs, D. and Artz, S.: Gene replacement and retrieval with recombinant M13mp bacteriophages. *J. Bacteriol.* 171:538-546 (1989)

Bolivar, F., Rodriguez, R.L., Betlach, M.C., and Boyer, H.W.: Construction and characterization of new cloning vectors. I. Ampicillin resistance derivatives of the plasmid pMB9. *Gene* 2: 75-93 (1977a)

Bolivar, F., Rodriguez, R.L., Greene, P.J., Betlach, M.C., Heyneker, H.L., Boyer, H.W., Crosa, J. and Falkow, S.: Construction and characterization of new cloning vectors. II. A multipurpose cloning system. *Gene* 2: 95-113 (1977b)

Bolívar, F.: Construction and characterization of new cloning vehicles. III. Derivatives of pBR322 carrying a unique *EcoRI* site for selection of *EcoRI* generated recombinant molecules. *Gene* 52:147-154 (1987)

Brown, N.L. and Evans, L.R.: Transposition in prokaryotes: transposon Tn501. *Res. Microbiol.* 142 : 689- 700 (1991)

Cappello, J., Crissman, J., Dorman, M., Mikolajczak, M., Textor, G., Marquet, M. and Ferrari, F.A.: The genetic production of synthetic crystalline protein polymers. *Mat. Res. Soc. Symp. Proc.* 174:267-276 (1990)

Covarrubias, L., Cervantes, L., Covarrubias, A., Soberón, X., Vichido, I., Blanco, A., Kuperstoch-Portnoy, Y.M. and Bolivar, F.: Construction and characterization of new cloning vehicles, V. Mobilization and coding properties of pBR322 and several deletion derivatives including pBR327 and pBR328. *Gene* 13:25-35 (1981)

Covarrubias, L. and Bolivar, F.: Construction and characterization of new cloning vehicles, VI. Plasmid pBR329, a new derivative of pBR328 lacking the 482-base-pair inverted duplication. *Gene* 17:79-89 (1982)

Cappello, J.: Genetic production of synthetic protein polymers. *MRS Bulletin.* 17:48-53 (1992)

Craig, N.L.: Tn7: a target site-specific transposon. *Mol. Microbiol.* 5:2569-2573 (1991)

Craig, N.L. and Kleckner, N.: Transposition and site-specific recombination. In *Escherichia coli and Salmonella typhimurium Cellular and Molecular Biology* (F.C. Niedhardt ed.) ASM Washington DC, pp. 1054-1070 (1987)

Crosa, J.H., Tolmasky, M.E., Actis, L.A. and Falkow, S.: Plasmids. In *Methods for General and Molecular Bacteriology*. (Gerhardt, P., Murray, R.G.E., Wood, W.A. and Krieg, N.R. eds) ASM Press, Massachusetts, pp 365-386 (1994)

Cruz, A., Coburn, C.M. and Beverley, S.M.: Double-targeted gene replacement for creating null mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 7170-7170 (1991)

de Lorenzo, V., Herrero, M., Jakubzik, U. and Timmis, K.N.: Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing and chromosomal insertion of cloned DNA in Gram-negative eubacteria. *J. Bacteriol.* 172:6568-6572 (1990)

Diedrich, L., Ramunssen, L.J. and Messer, W.: New cloning vectors for integration into the  $\lambda$  attachment site *attB* of the *Escherichia coli* chromosome. *Plasmid* 28:14-24 (1992)

Edlund, T. and Normak, S.: Recombination between short DNA homologies causes tandem duplications. *Nature* 292:269-271 (1981)

Ferrari, F.A., Richardson, C., Chambers, J., Causey, S.C., Pollock, T.J., Capello, J. and Crissman, J.W.: Construction of synthetic DNA and its use in large polypeptide synthesis. USA Patent No. 5,243,038, (1993)

Fossey, S.A., Némethy, G., Gibson, K.D. and Scheraga, H.A.: Conformational energy studies of  $\beta$ -sheets of model silk fibroin peptides. I. Sheets of poly (ala-gly) chains. *Biopolymers*. 31:1529-1541 (1991)

Gondo, Y., Nakamura, K., Nakao, K., Sasaoka, T., Ito, K., Kimura, M. and Katsuki, M.: Gene replacement of the p53 gene with the *lacZ* gene in mouse embryonic stem cells and mice by using two step homologous recombination. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 29:830-837 (1994)

Gossen, J.A., Molijn, A.C., Douglas, G.R. and Vijg, J.: Application of galactose-sensitive *E. coli* strains as selective hosts for LacZ<sup>+</sup> plasmids. *Nucl. Acids Res.* 20:3254-3255 (1992)

Gutierrez, A.A., Lemoine, N.R. and Sikora, K.: Gene therapy for cancer. *Lancet* 339: 715-721 (1992)

Gutterson, N.L. and Koshland, D.E.Jr.: Replacement and amplification of bacterial genes with sequences altered in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:4894-4898 (1983)

Hamilton, C.M., Aldea, M., Washburn, B.K., Babitzke, P. and Kushner, S.R.: New method for generating deletions and gene replacements in *E. coli*. *J. Bacteriol.* 171:4617-4622 (1989)

Hasty, P., Rivera, Pérez, J. and Bradley, A.: The length homology required for gene targeting in embryonic stem cells. *Mol. Cel. Biol.* 11: 5586-5591

Herrero, M., de Lorenzo, V. and Timmis, K.N.: Transposition vectors containing non-antibiotic resistance selectable markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in Gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* 172:6557-6567 (1990)

Herrero, M., de Lorenzo, V., Ensley, B. and Timmis, K.N.: A T7 polymerase-based system for the construction of *Pseudomonas* strains with phenotypes dependent on TOL-*meta* pathway effectors. *Gene* 134:103-106 (1993)

Jasin, M. and Schimmel, P.: Deletion of an essential gene in *E. coli* by site-specific recombination with linear DNA fragments. *J. Bacteriol.* 159:783-786 (1984)

Kühn, R., Schwenk, F., Aguet, M. and Rajewsky, K.: Inducible gene targeting in mice. *Science* 268:1427-1429 (1995)

Kuzminov, A., Schabatch, E. and Stahl, F.W.:  $\chi$  sites in combination with RecA protein increase survival of linear DNA in *E. coli* by inactivating *exoV* activity of RecBCD nuclease. *EMBO J.* 13:2764-2776 (1994)

Lederberg, J. and Lederberg, E.M.: Replica plating and indirect selection of bacterial mutants. *J. Bacteriol.* 63:399-406 (1952)

Lewin, L.: *Genes V.* Oxford University Press. (1994)

Luisi-DeLuca, C. and Kolodner, R.D.: Effect of terminal non-homology on intramolecular recombination of linear plasmid substrates in *E. coli*. *J. Mol. Biol.* 227:72-80 (1992)

Maugh, K.J. and Anderson, D.M.: *E. coli* expression vector encoding bioadhesive precursor protein analogs comprising 3 to 20 repeats of the decapeptide (ala-lys-pro-ser-tyr-pro-thr-tyr-lys) US Patent No. 5,149,657 (1992)

Mita, K., Ichimura, S. and James, T.C.: Highly repetitive structure and its organization of the silk fibroin gene. *J. Mol. Evol.* 38:583-592 (1994)

Neuman, J.R., Morency, C.A. and Russian, K.O.: A novel rapid assay for chloramphenicol acetyltransferase gene expression. *BioTechniques* 5:444-447 (1988)

Oden, K.L., DeVaux, L.C., Vibat, C.R.T., Cronan, J.E.Jr. and Gennis, R.B.: Genomic replacement in *Escherichia coli* K-12 using covalently closed circular plasmid DNA. *Gene* 96:29-36 (1990)

Porter, R.D.: Modes of gene transfer in bacteria. In: *Genetic Recombination* (Kucherlapati, R. and Smith, G.R. eds.) American Society for Microbiology. Washington DC pp 1-41 (1988)

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Herrero, M., de Lorenzo, V., Ensley, B. and Timmis, K.N.: A T7 polymerase-based system for the construction of *Pseudomonas* strains with phenotypes dependent on TOL-*meta* pathway effectors. *Gene* 134:103-106 (1993)

Jasin, M. and Schimmel, P.: Deletion of an essential gene in *E. coli* by site-specific recombination with linear DNA fragments. *J. Bacteriol.* 159:783-786 (1984)

Kühn, R., Schwenk, F., Aguet, M. and Rajewsky, K.: Inducible gene targeting in mice. *Science* 268:1427-1429 (1995)

Kuzminov, A., Schabatch, E. and Stahl, F.W.:  $\chi$  sites in combination with RecA protein increase survival of linear DNA in *E. coli* by inactivating *exoV* activity of RecBCD nuclease. *EMBO J.* 13:2764-2776 (1994)

Lederberg, J. and Lederberg, E.M.: Replica plating and indirect selection of bacterial mutants. *J. Bacteriol.* 63:399-406 (1952)

Lewin, L.: *Genes V.* Oxford University Press. (1994)

Luisi-DeLuca, C. and Kolodner, R.D.: Effect of terminal non-homology on intramolecular recombination of linear plasmid substrates in *E. coli*. *J. Mol. Biol.* 227:72-80 (1992)

Maugh, K.J. and Anderson, D.M.: *E. coli* expression vector encoding bioadhesive precursor protein analogs comprising 3 to 20 repeats of the decapeptide (ala-lys-pro-ser-tyr-pro-thr-tyr-lys) US Patent No. 5,149,657 (1992)

Mita, K., Ichimura, S. and James, T.C.: Highly repetitive structure and its organization of the silk fibroin gene. *J. Mol. Evol.* 38:583-592 (1994)

Neuman, J.R., Morency, C.A. and Russian, K.O.: A novel rapid assay for chloramphenicol acetyltransferase gene expression. *BioTechniques* 5:444-447 (1988)

Oden, K.L., DeVaux, L.C., Vibat, C.R.T., Cronan, J.E.Jr. and Gennis, R.B.: Genomic replacement in *Escherichia coli* K-12 using covalently closed circular plasmid DNA. *Gene* 96:29-36 (1990)

Porter, R.D.: Modes of gene transfer in bacteria. In: *Genetic Recombination* (Kucherlapati, R. and Smith, G.R. eds.) American Society for Microbiology. Washington DC pp 1-41 (1988)



Pouwels, P.H., Enger-Valk, B.E. and Brammar, W.J.: Cloning Vectors: A Laboratory Manual. Elsevier, Amsterdam (1985) (with annual supplements).

Rodriguez, R.L. and Denhardt, D.T.: (Eds) Vectors: a survey of molecular cloning vectors and their uses. Butterworths, Stoneham, MA (1988)

Saarlathi, H.T. and Palva, E.T.: In vivo transfer of chromosomal mutations onto copy number plasmids utilizing *polA* strains: cloning of an *ompR2* mutation in *E. coli* K-12. FEMS Microbiol. Lett. 26:27-33 (1985).

Seibel, P. Trappe, J., Villani, G., Klopstock, T. Papa, S. and Reichman, H.: Transfection of mitochondria: strategy towards gene therapy of mitochondrial DNA diseases. Nucl. Acids Res. 23: 10-17 (1995)

Shaw, W.V., Brenner, D.G. and Murray, I.A.: Regulation of antibiotic resistance in bacteria: the chloramphenicol acetyltransferase system. Curr. Top. Cell. Regul. 26:455-468 (1985)

Shen, P. and Huang, H.V.: Homologous recombination in *E. coli*: dependence on substrate length and homology. Genetics, 112:441-457 (1986)

Skrzypek, E., Haddix, P.L., Plano, G.V. and Straley, S.C.: New suicide vector for gene replacement in *Yersiniae* and other Gram-negative bacteria. Plasmid 29:160-163 (1993)

Soberón, X., Covarrubias, L. and Bolivar, F.: Construction and characterization of new cloning vehicles, IV. Gene 9:287-305 (1980)

Talmadge, K. and Gilbert, W.: Construction of plasmid vectors with unique *Pst*I cloning sites in a signal sequence coding region. Gene 12:235-241 (1980)

Taylor, A. W.: RecBCD enzyme of *Escherichia coli*. In Genetic Recombination (Kucherlapati, R. and Smith, G.R. eds). ASM Washington DC (1988)

Webb, J.R. and McMaster, W.R.: *Leishmania* major HEXBP deletion mutants generated by double targeted gene replacement. Mol. Biochem. Parasitol. 63: 231-242 (1994)

West, S.C.: Enzymes and molecular mechanisms of genetic recombination. Ann. Rev. Biochem. 61:603-640 (1992)

Winans, S.C., Elledge, S.J., Krueger, J.H. and Walker, G.C.: Site-directed insertion and deletion mutagenesis with cloned fragments in *E. coli*. *J. Bacteriol.* 161:1219-1221 (1985)

Yanisch-Perron, C., Vieira, J. and Messing, J.: Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33:103-119 (1985)

Yee, A.R. and Kronstandt, J.W.: Construction of chimeric alleles with altered specificity at the b incompatibility locus of *Ustilago maydis*. *Proc. natl. Acad. Sci. USA* 90: 664-668 (1993)

Zaman, M.M. and Boles, T.C.: Chi-dependent formation of linear plasmid DNA in exonuclease-deficient *recBCD*<sup>+</sup> strains of *E. coli*. *J. Bacteriol.* 176:5093-5100 (1994)

Zeef, L.A.H. and Bosch, L.: A technique for targeted mutagenesis of the EF-Tu chromosomal gene by M13-mediated gene replacement. *Mol. Gen. Genet.* 238:252-260 (1993)

Zou, Y.R., Muller, W., Gu, H. and Rajewsky, K.: Cre-loxP mediated gene replacement: a mouse strain producing humanized antibodies. *Curr. Biol.* 4: 1099-1103 (1994)

Zurita, M., Bolivar, F. and Soberón, X.: Construction and characterization of new cloning vehicles, VII. Construction of plasmid pBR329par, a completely sequenced, stable derivative of pBR327 containing the par locus of pSC101. *Gene* 28: 119-122 (1984)