

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS
Centro de Investigación en Dinámica Celular

“Caracterización de la actividad tóxica de la RNA helicasa dependiente de ATP HrpB y del dominio glicosil-transferasa de la proteína PBP provenientes de la bacteria entomopatógena *Serratia entomophila* Mor 4.1”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Luz Areli Gorostieta Nava

DIRECTOR DE TESIS
Dra. María Eugenia Nuñez Valdez



DR. Jean Michel Grévy Macquart
COORDINADOR DEL POSGRADO EN CIENCIAS
PRESENTE

Atendiendo a la solicitud para emitir DICTAMEN sobre la revisión de la TESIS titulada “Caracterización de la actividad tóxica de la RNA helicasa dependiente de ATP HrpB y del dominio glicosil-transferasa de la proteína PBP provenientes de la bacteria entomopatógena *Serratia entomophila* Mor 4.1”, que presenta la alumna **Luz Areli Gorostieta Nava (10019228)** para obtener el título de **Maestro en Ciencias**.

Nos permitimos informarle que nuestro voto es:

NOMBRE	DICTAMEN	FIRMA
Dra. Sonia Dávila Ramos CIDC-UAEM	APROBADO	
Dr. Nelson Avonce Vergara CIDC-UAEM	APROBADO	
Dra. Gloria Saab Rincón IBT-UNAM	APROBADO	
Dra. Claudia Martínez Anaya IBT-UNAM	APROBADO	
Dra. María Eugenia Nuñez Valdez CIDC-UAEM	APROBADO	



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

SONIA DAVILA RAMOS | Fecha:2020-12-01 10:54:08 | Firmante

SMeNYHPigWBwJuC6ONuz0BK0NRjBD713aSYmXSD6ly/i08uPmSiEI2KlIkE7wVqhsHD9F6wHOqn9nXeWKULzXUvldbjdMeo77aB1j3/qt5TJyV9UftSE+JYRUu5utFOsTQWM4IP5WwsROm3L4KvO09jwceX34LzSpSUwCiKXAOGPhzLadJDaM2G0fgRmWrMCI1EUI9rKslqseLcAdlyJC/hIWCvzMXx7SkrvRNXJ1E99aIdwqhYQMNAdE2af/9OapVy9VKI2z3zp3AKr7yag57iOSwuu6F2iCi+fr5ykjNyJcMk+K0qgyZM36DEYPjllNW6+gNidq2B960b7eBiP1g==

NELSON AVONCE VERGARA | Fecha:2020-12-01 12:41:24 | Firmante

yO9486vnli1vw5LrlnCHUDT6FTu CZPOa3hpX5e9X0Rv2UpJ8uz3Wgt8lijKOGZtjCiePs0yC8Z6/pFHbcWvS/JsOBZnEASKETjRCbmV/xOPKpPLO16blVmeVh935PuTvSrMqsWds3HOY3yJa8to7QZ9WSW+ilsWOPLzoRNdOn1oU8yvStusUjNQLxgkUKxYC8OvanmM0D/BVJV8fE4gyCvfw9nMtKNY2ziZu1rJ/Yex8jDuAkBFbn4Wlq1Q2j8ZZ31tzia9+q0k5eJrrkT33i3v16kqfCiTs8bwaoZMbpG9Y8QO6EJTRFADTPoasDliGyDMY2YV8n6gmroxlelSnQQ==

CLAUDIA MARTÍNEZ ANAYA | Fecha:2020-12-01 16:59:20 | Firmante

t8pz/PO/0gtPVMNOK2PNuxevMGSGOoikJdW2+iKPbedczEOX59ysfovIAdo/HU7zTYOJoxq6s5kcZ1Bwzp/qX1N7FwesOZ231HjfhN7Nrdobj1zg67dNlx8GYje7GQSnGsxjP6s6bhDpABwS60T38EOJ2BTS4vorES8/KEtSu4wtLf7Fq5w1AUstJTHPzkrq+neUrlWUDB63MJ0PncWqNNGDyZUN/EoKbXEYIMlc50r2om7HFugpZHEK8WfSg2gvkR+k/wEiQsflaeEIdKyk9heBTsQuF+aUP2weLR/4fJ5PuNc0ejR291Qui9Ira5mHay9S1EHgtluaxDfs6ug==

MARIA EUGENIA NUÑEZ VALDEZ | Fecha:2020-12-01 17:28:44 | Firmante

hd/xpnw1Ju6a+1hay2hD7vOayqeZ06439Ca2ZufT9n/H5611GKBRRDmN0QeT6IM1mRd1XSSxRjU+0nuo0YS2yvPoY86FH44oclorZi+fn+wx94YHE65CnTW9Qq/THu6PoXO5d9A7/SU2jOIsob1xQiOuys/iM7KLufIP1jq/1RhuFNuEuHraQ8juOoJ5kHOLsZazNIIEHedDKUPiwl6x9gqM7zskyCzeNQGbpUR5o6Bh6LBPxhfmAiVIMB5YEObPubq9JbS/ASwytTw5WJj2DXTydbWgU5NbmhkDXYhcaS7tuDhYcRAxtDmwTvqEqxNsklYLUmVUfJq7ZFQjG6/xg==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



4nRluK

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/dRLOIS8qlEMxuoFgqtyH4qBNLAVm3kcc>



Resumen

En el estado de Morelos se aisló *Serratia entomophila* Mor 4.1, (*SeMor4.1*; Núñez-Valdez et al., 2008) que es una bacteria entomopatógena hacia larvas de *Phyllophaga blanchardi* (Coleoptera: Melolonthidae) y *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). A partir de la subclona C8-F3 proveniente de la genoteca de *SeMor4.1*, se identificaron genes asociados a la toxicidad que codifican para el dominio glicosiltransferasa (GT) de una proteína de unión a penicilina 1b (PBP) y una RNA helicasa (RNA-HEL). El objetivo de este proyecto es caracterizar de manera independiente la actividad tóxica de las dos proteínas, la GT-PBP y la RNA-HEL, mediante bioensayos con larvas de *Phyllophaga* y/o *S. frugiperda*. Primeramente, se siguió una estrategia genética llevando a cabo la clonación con dos pasos principales para la expresión de ambos genes, los cuales primeramente se clonaron por separado (junto con sus regiones respectivas de promotor) en el vector de clonación pBluescript Sk+ (pSK). A partir de la clona C8-F3 y el vector pSK digeridos con las enzimas EcoRI y SmaI se obtuvo, después de la ligación, la construcción pSKHEL (5.6 Kpb); este plásmido se transformó en la cepa *E. coli* Epi 300™. Posteriormente, se evaluó la actividad tóxica de dicha construcción mediante bioensayos de inyección en *Phyllophaga* sp con sobrenadantes de cultivo libres de bacteria. Se observó que al día 7 del bioensayo la DL50 pSK-Hel fue de 18.661 µg/larva. Paralelamente se realizaron bioensayos de toxicidad con F3 y con pSK- GT-PBP (Clona E9) siendo la DL50 de 20.159 µg/larva para F3 y de 24.375 µg/larva para pSK- GT-PBP; los resultados sugieren que ambas proteínas presentan actividad tóxica de manera independiente. El siguiente paso, encaminado a la expresión de las proteínas, fue clonar sus genes en el vector de expresión pET-22b(+). El vector fue digerido con NotI/Eco53kI y, para la obtención del inserto, se utilizó la construcción previamente obtenida pTZ/SK-HEL que fue digerida con NotI y HincII, obteniéndose después de la ligación, la construcción pET-HEL de 7.9 Kpb en la cepa *E. coli* BL21. Para la clonación de GT-PBP en el sistema de expresión pET-22b (+) se obtuvo el inserto a partir del plásmido p31-GT-PBP; la digestión en el vector y el inserto se realizó con EcoRI y HindIII. Después de la ligación se obtuvo la construcción pET-GT-PBP de 6.8 Kpb, este plásmido se transformó en *E. coli* BL21. Se lograron avances en la expresión de GT-PBP y se determinó que el mayor rendimiento se obtiene a 25°C con la adición de 0.5 mM IPTG, 24 h después de la inducción. En geles de poliacrilamida se observó una proteína purificada con el peso

esperado de 54 kDa. Con respecto a la expresión de la RNA-Hel a partir de pET-HEL, se evaluaron diferentes condiciones para su expresión sin obtener resultados contundentes de expresión.

**ESTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN DINÁMICA CELULAR
BAJO LA DIRECCIÓN DE LA
DRA. MARÍA EUGENIA NUÑEZ VALDEZ**

AGRADECIMIENTOS

SE AGRADECE AL CONACYT POR EL APOYO OTORGADO PARA LA

REALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO

No BECARIO 930323

A CARGO DE LA DRA. MARÍA EUGENIA NUÑEZ VALDEZ

Agradecimientos

Quiero agradecer a la Dra. María Eugenia Nuñez Valdez, quien me acepto como parte de su equipo de trabajo, agradezco mucho la confianza que me ha dado, los consejos y sobre todo las vivencias en el laboratorio, siempre ha sido para mí alguien de admirar. GRACIAS por no dudar de mi capacidad y sobre todo enseñarme todos los saberes del laboratorio, gracias por siempre apoyarme en todas las ideas que tengo, siempre ha sido una ayuda y apoyo para mí.

A los Doctores que fueron parte de mi comité sinodal y comité revisor de tesis, Dra. Claudia, Dr. Nelson, Dra. Carmen. Gracias por sus aportes a este trabajo, estoy muy agradecida con ustedes porque siempre sumaron a este trabajo, y hacerme crecer en cada presentación.

Quiero hacer un agradecimiento especial a mis padres Sergio y Silvia, a quienes les debo la mujer que soy, gracias por enseñarme a ser una mujer perseverante y siempre creer ciegamente en mí, gracias padre por apoyarme económicamente y siempre impulsarme a alcanzar mis metas, gracias madre por siempre creer en mí, ser mi consejera y confidente, los quiero.

A mis hermanos Alejandro, Alexis y Alexander por ser mis hermanos y apoyarme siempre. A nuestra nueva familia Andrea, Madahi y Sergio, ustedes son parte de mi motivación.

Agradezco a mis compañeros de laboratorio siempre estar ahí en el trabajo de día a día, por compartir sus almuerzos con esta foránea, gracias Sofi y Mafer por esperarme siempre para irnos juntas.

A todos y cada uno de mis amigos, en especial a mi amiga Edith por siempre ayudarme en todos mis trámites, y por supuesto siempre estar pendiente de mí.

Agradezco mucho a la familia de mi madre, que siempre están pendientes de ella y han hecho menos tristes mis ausencias.

A mis amados sobrinos

INDICE	Pág.
1 Introducción	1
1.1 La agricultura y sus complicaciones	2
1.2 Las plagas en la agricultura	2
1.3 Los Coleópteros como plaga de importancia en México	3
1.3.1 Características morfológicas de <i>Phyllophaga</i>	3
1.4 El Control químico y su impacto negativo	4
1.5 El control biológico	5
1.5.1 Los bioinsecticidas	6
1.5.2 Bacterias entomopatógenas	6
1.5.2.1 Clasificación de las bacterias entomopatógenas	6
1.6 ¿Qué son, y para qué sirven los factores de virulencia?	7
1.6.1 Factores asociados con la adherencia	8
1.6.2 Factores asociados a la invasión bacteriana	8
1.6.3 Factores asociados con la sobrevivencia celular	9
1.6.4 Factores asociados con los sistemas de secreción bacteriana	10
1.6.5 Vesículas de membrana	11
1.6.6 Biopelículas	12
1.7 Características de la cepa <i>S. entomophila</i> A1M02	13
1.8 Antecedentes generales	13
1.8.1 <i>S. entomophila</i> Mor 4.1 (SeMor4.1) cepa mexicana	13
1.8.2 Construcción de genoteca del genoma de <i>S. entomophila</i>	14
1.8.3 La clona C8	17
1.9 Antecedentes directos	17
1.9.1 La subclona C8-F3	17
1.9.2 Mutantes a partir de la subclona C8-F3	18
1.9.3 Las proteínas PBP	18
1.9.3.1 ¿Cuál es la función de las proteínas PBP?	18
1.9.3.2 Clasificación de las proteínas PBP	19
1.9.3.3 Las proteínas PBPs clase 1b	20
1.9.3.4 El dominio GT-PBP de <i>SeMor4.1</i>	21
1.10 La proteína RNA helicasa dependiente de ATP HrpB	22
1.10.1 Papel de las Helicasas DEAD-box en la patogenicidad	
2 Justificación	25
3 Hipótesis	25
4 Objetivos	25
4.1 Objetivo general	25
4.1.1 Objetivos particulares	25
5 Materiales y métodos	26
5.1 Cepas y cultivos	26
5.1.1 Cultivo de bacterias	26
5.1.2 Enzimas	27
5.2 Aislamiento del gen RNA-HEL a partir de C8-F3	27
5.2.1 Preparación de ADN plasmídico por método de lisado alcalino	27

5.2.2	Extracción de plásmido por método cloruro de litio y extracción fenólica	28
5.2.2.1	Cuantificación de ADN	28
5.2.3	Preparación del inserto a partir de F3	28
5.2.3.1	Protocolo de digestiones para preparación de inserto	28
5.2.4	Preparación del vector de clonación pBluescript SK +	30
5.2.4.1	Selección de plásmidos recombinantes por alfa-complementación	30
5.2.4.2	Protocolo de digestiones para vector	31
5.2.5	Preparación de células competentes por método CaCl ₂	31
5.2.5.1	Método de transformación de células competentes	32
5.2.6	Selección de células transformadas	33
5.2.6.5	Selección de cepas transformadas	33
5.3	Caracterización de las proteínas	33
5.3	Expresión del gen RNA-HEL	33
5.3.1	Colecta y selección de larvas	33
5.3.2	Identificación de larvas	33
5.3.3	Bioensayos de inyección en larvas	33
5.4.	Sobrenadantes de cultivos libres de bacterias	34
5.4.1	Cuantificación de la proteína	34
5.5	Expresión del gen de RNA-HEL en el sistema de vectores pQE	34
5.5.1	Obtención del inserto de la RNA-HEL mediante enzimas de restricción	35
5.5.1.1	Preparación del inserto a partir de pSK-HEL	36
5.5.1.2	Protocolo de digestiones para preparación de inserto	37
5.5.1.3	Preparación del vector de expresión pQE-31	37
5.5.1.4	Protocolo de digestiones para preparación del vector pQE-31	37
5.5.2	Ligación vector e inserto	38
5.6	Sistema de expresión pET-22b(+)	40
5.6.1	PCR para clonar en el vector pET-22b(+)	40
5.6.2	Construcción pTZ-HEL	40
5.6.2.1	Reacción de ligación	40
5.6.3	Construcción de pTZ-SK-HEL	41
5.6.4	Construcción de la RNA-HEL en pET-22b(+)	41
5.6.5	Construcción de pET-GT-PBP	42
5.6.5.1	Preparación del vector pET-22b(+)	42
5.6.5.2	Preparación del inserto a partir de pQE-GT-PBP	42
5.6.5.3	Ligación del vector pET-22b(+) y el inserto portador de GT-PBP	43
5.7	Purificación de las proteínas recombinantes	43
5.7.1	Expresión y purificación de las proteínas con afinidad al Níquel	44
5.7.1.1	Inducción de las proteínas recombinantes (sistema de vectores de expresión pQE y pET)	44
5.7.1.2	Cosecha de células	44

5.7.2	Extracción de proteínas bajo el sistema de expresión Pqe	45
5.7.2.1	Lisado celular (12.5 ml-15 ml)	46
5.7.3	Purificación de proteínas del Periplasma	47
5.7.3.1	Extracción de proteínas del Periplasma	47
5.8	Purificación de las proteínas con afinidad al Níquel	47
5.8.1	Protocolo de purificación de proteínas con afinidad al Níquel (BATCH)	48
5.9	Electroforesis en gel de poliacrilamida	48
5.9.1	Preparación del gel de poliacrilamida	48
5.10	Detección de las proteínas recombinantes por Western Blot	48
6	Resultados	48
6.1	Objetivo 1	48
6.1.1	Selección de candidatos por perfil de restricción	49
6.2	Construcción de la clona pSK-HEL	
6.3	Determinación de la actividad toxica de la RNA-HEL	49
6.4	Objetivo 2	50
6.4.1	Construcción de p31-HEL	50
6.4.2	Inducción de la RNA-HEL en el sistema de vectores de expresión pQE	51
6.4.3	Sistema de expresión pET -22B	55
6.4.4	Construcción de pTZ-HEL	55
6.4.4.1	Secuenciación de pTZ-HEL	56
6.4.5	Construcción de pTZ-SK-HEL	57
6.5	Construcción de la RNA-HEL en pET-22b(+)	57
6.5.1	Secuenciación de pET22-HEL	57
6.6	Construcción pET-GT-PBP	58
6.6.1	Secuenciación de pET-GT-PBP	59
6.7	Objetivo 3	60
6.7.1	Purificación de GT-PBP	61
6.8	Expresión de la RNA-HEL	62
7	Discusiones	63
8	Conclusiones	64
9	Perspectivas	65
10	Anexos	65
11	Bibliografía	72

INDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1 Principales plagas en México	4
Figura 2 Ciclo biológico de <i>Phyllophaga</i> sp	6
Figura 3 Bioensayos orales multidosis	17
Figura 4 Mortalidad de larvas de <i>Phyllophaga</i>	18
Figura 5 Digestión con BamHI en clonas con actividad tóxica	19
Figura 6 Mapa de la secuencia de la clona C8	20
Figura 7 Porcentaje máximo de mortalidad obtenido en larvas de tercer estadio	21
Figura 8 Mortalidad observada del día 1 al 12 del bioensayo	26
Figura 9 Tetra-péptido del glicano (izquierda) Pared celular de bacteria Gram negativa (derecha)	
Figura 10 Alineamiento de PBP 1B de <i>E. coli</i> K12 y PBP 1B de <i>SeMor4.1</i>	
Figura 11 Comparación de PBP 1B de <i>E. coli</i> K12 y PBP 1B de <i>SeMor4.1</i>	
Figura 12 Gel de Acrilamida al 10% análisis de fracciones nativas	27
Figura 13 Análisis de la RNA-HEL de <i>SeMor4.1</i>	
Figura 14 Preparación del inserto a partir de C8-F3	
Figura 15 Vector de clonación pSK +	35
Figura 16 Ligación del vector e inserto	36
Figura 17 Identificación de larvas	37
Figura 18 Vector de expresión pQE-31	
Figura 19 Sitio de corte con HincII	42
Figura 20 Preparación del vector	42
Figura 21 Ligación del vector e inserto	44
Figura 22 Comparación de los sistemas de expresión	46
Figura 23 Oligonucleótidos en F3	
Figura 24 Construcción de pTZ-SK-HEL	
Figura 25 Purificación de proteínas recombinantes con 6xHis	
Figura 26 Interacción de la resina con la proteína recombinante	50
Figura 27 Selección de candidatos	51
Figura 28 Gel para selección de candidatos por peso molecular	52
Figura 29 Construcción de pSK-HEL	53
Figura 30 pSK-HEL	53
Figura 31 Gráfica F3	53
Figura 32 Gráfica pSK-HEL	54
Figura 33 Gráfica E9	54
Figura 34 Curva de DL50 por el programa Probit	55
Figura 35 Gel de agarosa con candidatos positivos	56
Figura 36 Construcción de p31-Hel	56
Figura 37 Alineamiento de los candidatos secuenciados	57
Figura 38 Gel de acrilamida al 10% condiciones desnaturizantes	58
Figura 39 Construcción pTZ-HEL	59
Figura 40 Diagrama de secuencia	59
Figura 41 Construcción pTZ-SK-HEL	60
Figura 42 Construcción de pET22-HEL	61
Figura 43 Diagrama de secuenciación pET22-HEL	61

Figura 44 Construcción pET22-GT-PBP	62
Figura 45 Diagrama de secuenciación pET22-GT-PBP	62
Figura 46 Análisis de fracciones totales	63
Figura 47 Cinética de crecimiento	64
Figura 48 Purificación de la proteína Recombinante	65
Figura 49 Gel de Acrilamida al 10% con fracciones peri plasmáticas (TCA)	68
Figura 50 Gel de acrilamida al 10% con SB libres de bacterias concentrados con TCA	68

Índice de tablas

	Pág.
Tabla 1 Subclonas obtenidas de C8-F3	
Tabla 2 Cepas, clonas y plásmidos	
Tabla 3 Registro de datos	
Tabla 4 Diseño de oligonucleótidos	
Tabla 5 Reacción de PCR para amplificación de RNA-HEL y GT-PBP	

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

AM	Antes meridiano	Miniprep	Minipreparación
Amp	Ampicilina	MPM	Marcador de peso molecular
ATP	Adenosín trifosfato	mM	Milimolar
Bla Bt	β -lactamasa <i>Bacillus thuringiensis</i>	MurNAc	Acetilmurámico Acetato de sodio
Cterminal	Carboxilo terminal	NaAc	sodio
DL50	Dosis letal 50	NaCl	Cloruro de Sodio
DNA	Ácido desoxirribonucleico	NaOH	Hidróxido de sodio
DO	Densidad óptica	ng	Nanogramo
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético	nm	Nanómetro
DTT	Ditiotreitol	No	Número
g	Gramo	O/N	Toda la noche
GlcNAc	Acetilglucosamina	ORF's	Marco de lectura abiertos
H H₂O	Hora Agua	Pb	Pares de bases
HCl	Ácido clorhídrico	PBP	Proteína de unión a penicilina
IPTG	Isopropil- β -D-1tiogalactopiranosido	RBS	Sitio de unión al Ribosoma
Kb	Kilobases	RNA	Ácido ribonucleico
		rpm	Revoluciones por minuto
		SDS-	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
		PAGE	

KDa	Kilodaltons	Sb+Pk	Sobrenadante sometido a la acción de la Proteinasa K Sobrenadante sin hervir
Km	Kanamicina	Sb-H	hervir
L	Litro	SeMor4.1	<i>Serratia entomophila</i> Mor 4.1
LB	Luria Bertani	Sb+H	Sobrenadante hervido
M	Molar	SMS	Suite de manipulación de secuencias
mm	Milímetro	TA	Temperatura Ambiente
Min	Minuto		
ml	Mililitro		
TA	Temperatura ambiente		
u	Unidad		
USSDNA	Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA		
UV	Radiación ultravioleta		
x g	Por gravedades		
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido		
6xHis	6 residuos de Histidina		
μ g	Microgramo		
μ l	Microlitro		

1. Introducción

En México, las larvas de escarabajo conocidas como “gallina ciega” (orden Coleóptera) son la segunda plaga más importante en cultivos de maíz (Granados, 2001); dentro de este orden el género *Phyllophaga* es una plaga que genera numerosas pérdidas económicas. En el estado de Morelos se aisló la cepa *S. entomophila* Mor 4.1 (*SeMor4.1*; Núñez-Valdez et al., 2008), que es una bacteria entomopatógena hacia larvas de *P. blanchardi* (Coleoptera: Melolonthidae). Para identificar los factores de virulencia, se aislaron 5 clonas insecticidas de la genóteca de *SeMor4.1* expresada en *E. coli* (Rodríguez-Segura et al., 2012). A partir de la subclona C8-F3, se identificaron genes asociados a la toxicidad, que codifican para el dominio glicosil-transferasa de una proteína de unión a penicilina 1b (PBP), la cual pertenece a un grupo de enzimas que se encuentran involucradas en los últimos pasos de la síntesis del peptidoglicano, y una RNA helicasa HrpB (RNAHel). Se evaluaron mediante bioensayos con larvas de *P. blanchardi* dos mutantes de la clona C8-F3 denominadas $\Delta B1$ y $\Delta E9$, mismas que sugieren que ambas proteínas están implicadas en la actividad tóxica hacia larvas del insecto *Phyllophaga* (Díaz-Sánchez, 2014). En la clona C8-F3 quedó únicamente el dominio N-terminal y se perdió el dominio transpeptidasa ubicado en el C-terminal, quedando únicamente el dominio glicosil-transferasa intacto y el dominio UB2H. El dominio GT es responsable de la actividad glicosil-transferasa y de igual manera cataliza la elongación de las cadenas reticuladas del peptidoglicano (Spratt et al., 1996; Sauvage y Terrak, 2016). Para determinar si el dominio gt-PBP de *SeMor4.1* funciona como una toxina fue necesario expresar el dominio gt-PBP en un sistema de vectores de expresión pQE (QIAGEN). Así, el dominio gt-PBP ha sido clonado y expresado en un sistema heterólogo y la purificación se realizó de forma nativa a partir de cultivos de volumen pequeño (15 ml; Gorostieta-Nava, 2018). Sin embargo, no fue posible en esta etapa evaluar la actividad tóxica de la proteína, por lo tanto, uno de los objetivos de este proyecto es purificar dicha proteína a partir del escalamiento de volúmenes de cultivo bacteriano mediante columnas de afinidad y así caracterizar su actividad en larvas de *Phyllophaga* y/o *Spodoptera frugiperda*.

Dentro de la subclona C8-F3 se encuentra otra proteína, la RNA-HEL, que de acuerdo con estudios previos del laboratorio (Díaz-Sánchez, 2014), se sugiere que también está implicada en la actividad tóxica hacia larvas del insecto *Phyllophaga*. Las RNA helicasas

dependientes de ATP son enzimas que catalizan la separación de ácidos nucleicos bicatenarios (dsRNA) de manera dependiente de energía y están presentes en todos los reinos (Cordin et al., 2006; Granato, 2016).

Se desconoce el rol de la RNA-HEL y de GT-PBP de *SeMor4.1* en la actividad tóxica, ya que la evidencia demostrada es únicamente genética. No se sabe si ambas proteínas actúan como toxinas de manera directa e independiente. El objetivo de este proyecto es caracterizar de manera independiente la actividad tóxica de las dos proteínas GT-PBP y la RNA-HEL, mediante bioensayos con larvas de *Phyllophaga* y/o *S. frugiperda*. Esto permitirá determinar si ambas proteínas funcionan como toxinas o bien, ejercen su actividad de manera indirecta, alterando otros componentes bacterianos desconocidos que participan directamente en la actividad tóxica.

1.1 La agricultura y sus complicaciones

Actualmente la elevada demanda por alimentos de una población humana en continuo crecimiento, el deterioro del medio ambiente y la calidad de vida del hombre, son solo algunos de los aspectos que han promovido la búsqueda de nuevos procesos de producción agrícola con el fin de cubrir dicha demanda de alimento (FAO, 2018). Uno de los mayores retos que enfrenta la agricultura actual es lograr una productividad elevada conservando los recursos naturales. La sustentabilidad agrícola requiere que la misma sea suficientemente productiva, económicamente viable, conserve la base de recursos naturales y preserve la integridad del ambiente (Sarandón y Sarandón, 1993). Existen múltiples factores que provocan bajos rendimientos de producción, entre ellos se encuentran las plagas de insectos (Ramírez-Salinas et al., 2000). El término “plaga” no existe en la naturaleza, es un término antropocéntrico definido como “Un organismo que reduce la disponibilidad, calidad o valor de algunos recursos humanos” (Flint y Van Den Bosch et al., 1981).

1.2 Las plagas en agricultura

El total de pérdidas económicas anuales causadas por plagas de insectos alcanza los \$ 17.7 mil millones de dólares en el mundo (Oliveira et al., 2014). Se han reportado en el mundo casi un millón de especies de insectos, cerca de las cuales 15 000 de ellas son consideradas como insectos plaga y alrededor de 300 obtienen atención especial (Chattopadhyay et al.,

2017). El problema se agrava en países en vías de desarrollo, como la mayor parte de los países latinoamericanos, incluyendo a México (Ruíz et al., 2013).

Con respecto a nuestro país, el campo Mexicano debe generar más alimentos a corto plazo y de buena calidad para poder satisfacer las necesidades de sus habitantes (Núñez-Valdez et al., 2004). En México hay un gran número de plagas, siendo los lepidopteros, coleopteros y dípteros (Figura 1) las plagas más importantes y peligrosas que generan mayores pérdidas económicas al año (Granados et al., 2001).

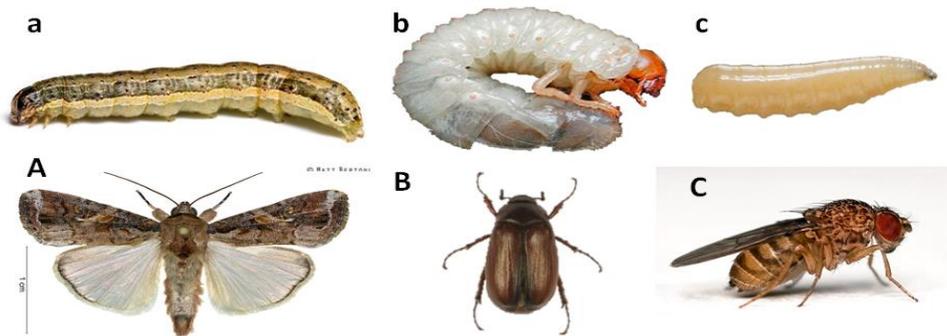


Figura 1 Principales plagas en México. Panel a) y A) Larva y adulto de lepidoptero (*Spodoptera frugiperda*); b) y B) Larva y adulto de coleoptero (*P. blanchardi*); c) y C) Larva y adulto de díptero (*Drosophila melanogaster*).

1.3 Los coleópteros como plaga de importancia económica en México

Uno de los insectos que mayor problema causa como plaga, son las larvas de escarabajo del género *Phyllophaga* (coleoptera: Scarabaeidae) de hábitos rizófagos. Dicho género constituye el segundo grupo más importante en cuanto a plagas potenciales en México (Granados et al., 2001). En México, 68 especies de la subfamilia *Melolonthinae* del orden coleoptera se han considerado como plagas o plagas potenciales (Morón, 1994). Investigaciones recientes agrupan el 80% de las especies de insectos plaga, resistentes a insecticidas en los órdenes coleóptera, díptera, heteróptera y lepidóptera lo cual resulta alarmante, debido a la incidencia de las plagas (Bielza y Contreras, 2005) que se alimentan de gramíneas, sorgo, hortalizas, plantas ornamentales, pastos, y malezas. Debido a sus hábitos rizófagos, el control mediante productos químicos ha sido poco eficiente ya que los

productos no llegan a los sitios donde las larvas se encuentran alojadas, lo que dificulta su control y los costos de producción (Ramírez-Salinas et al., 2000).

1.3.1 Características morfológicas de *Phyllophaga*

Presentan metamorfosis completa, por lo que se denominan holometábolos. Durante el ciclo de vida de *Phyllophaga spp* (Figura 2) atraviesan por cuatro fases marcadamente distintivas: huevo, larva, pupa y adulto (Morón et al., 1984). Las larvas atraviesan por tres estadios (L1, L2, L3), siendo durante el estadio L3 el periodo en el cual causan el mayor daño a los cultivos, ya que durante este estadio una sola larva puede llegar a cercenar las raíces de una sola planta y causarle la muerte (Morón et al., 1988). Por sus hábitos rizófagos, se encuentra entre los insectos del suelo más destructores y problemáticos de numerosas plantas cultivadas, debido a que el control que se aplica es difícil de llegar hasta la raíz de planta (Granados et al., 2001).



Figura 2 Ciclo biológico de *Phyllophaga sp.* En esta figura se muestra el ciclo biológico de *phyllophaga sp* en el cual inicialmente el adulto pone sus huevos, los cuales emergen en larvas y atraviesan por tres estadios (L1, L2, L3), posteriormente pasa a ser pupa, llegando así a adulto y así continuar el ciclo. Su desarrollo comprende 4 fases muy marcadas: huevo, larva, pupa y adulto. (Tomado de <http://www.bayercropscience.com.mx/> 11/04/18).

1.4 El Control químico y su impacto negativo

Los insecticidas químicos representan una importante alternativa para el manejo de plagas agrícolas, pero la aplicación de una gran cantidad de sustancias químicas contra diversos organismos dañinos ha propiciado efectos negativos sobre la salud humana y daños sobre los

ecosistemas (Ferrer, 2003). En aras de la sustentabilidad es necesario restringir su uso al mínimo indispensable por sus efectos negativos (Chirinos y Geraud, 2011). El uso de los plaguicidas genera una fuerte presión de selección, este factor lleva a un proceso de evolución acelerada, seleccionando especies de poblaciones resistentes a los mismos, haciendo necesario aumentar las dosis para lograr efectividad, generando un mayor costo de la producción, daños a la salud, tanto del trabajador como del consumidor, dejando también una carga al ambiente en general (Chirinos y Geraud, 2011). Entre los daños principales que causa el uso de control químico se encuentran: a) la toxicidad hacia el humano e incluso animales domésticos; b) eliminación de organismos benéficos; c) contaminación de los suelos, aguas superficiales y mantos freáticos; d) resistencia a los químicos, ya que los insectos plaga se encuentran con una presión de selección muy fuerte (Chattopadhyay et al., 2017; Villalobos et al., 2001). Las evidencias indican que los plaguicidas representan un riesgo a la salud pública, por lo que debe romperse el esquema convencional del uso de control químico como única alternativa para hacer frente al problema de las plagas (Plenge-Tellechea et al., 2007). A pesar de que muchos plaguicidas químicos ya han sido prohibidos en muchos países, estos siguen a la venta sin conocer a fondo el impacto negativo que pueden tener en los ecosistemas y en la salud pública (Chattopadhyay et al., 2017; Plenge-Tellechea et al., 2007). Debido a que la economía de muchos países depende de la agricultura, esto lleva a una constante lucha entre el ambiente, la salud y las ganancias producidas por la agricultura.

1.5 Control biológico

Mediante el control biológico se busca restablecer el perturbado equilibrio ecológico con el uso de organismos vivos o sus metabolitos, para reducir la población de un organismo plaga específico, haciéndolo menos abundante o dañino de lo que podría ser (Badii et al., 2006). El control biológico (usando tanto organismos vivos, como sus componentes) es altamente específico, fácil de biodegradar y fácil de usar para la agricultura sustentable (Chattopadhyay et al., 2017). Esta medida de control debe ir en ascenso debido al número de casos de plagas resistentes, de igual manera constituye para América Latina el método de control de plagas más viable, ecológicamente recomendable y autosustentable (Altieri et al., 1989). La gran

mayoría de las plagas tienen varios enemigos naturales que se pueden clasificar en tres grandes grupos: 1) parásitos, b) depredadores y c) entomopatógenos. Dentro de los Entomopatógenos se encuentran: bacterias, hongos, virus, nematodos y protozoos que se caracterizan por ser altamente específicos, el daño a la biodiversidad es casi nulo y tienen poco o ningún efecto colateral hacia otros organismos, incluso al hombre; además y tienen la aptitud para ser formulados industrialmente. De igual manera se pueden formular, empaquetar, almacenar y comercializar como insecticidas convencionales (Badii et al., 2006). De los 5 grupos de microorganismos mencionados anteriormente, las bacterias ocupan un lugar imponente, ya que en este grupo se incluye *Bacillus thuringiensis* (Bt) la bacteria más estudiada y comercializada para el control de plagas (Salazar et al., 2016). Recientemente se ha llevado a cabo la introducción de nuevas técnicas en la agricultura, tal es el caso de la ingeniería genética que incluye la introducción artificial de genes específicos de una especie a otra. Esta tecnología ha permitido mejorar plantas y cultivos, haciendo estos resistentes a enfermedades y plagas específicas. Este conocimiento ha abierto un sinfín de posibilidades para usar los metabolitos de algunos patógenos, y así abrir el extenso panorama para incrementar el uso del control biológico como una herramienta sustentable (Del Rincón-Castro e Ibarra, 2005).

1.5.1 Los bioinsecticidas

El término bioinsecticida, también llamado bioplaguicida se define como un organismo vivo (hongos, bacterias, virus, protozoos, nematodos y células vegetales), o sus extractos, toxinas, enzimas, sus combinaciones e incluso sus genes, utilizados para controlar o proteger a otros organismos de las plagas (Chattopadhyay et al., 2017). Los bioinsecticidas son una herramienta potencial para ser utilizada para la seguridad ambiental (Vimaia Devi et al. 2012). Es necesario tener enfoques más racionales para popularizar los bioinsecticidas como uno de los insumos importantes para una agricultura segura y sustentable (Kamble et al. 2016). Cabe destacar que a pesar de que existe controversia entre si deben ser o no considerados dentro del control biológico, de acuerdo con la definición de Badii en el 2006, los bioinsecticidas, sean los microorganismos o sus metabolitos, por sus múltiples beneficios, son considerados parte del control biológico.

1.5.2 Bacterias entomopatógenas

Las bacterias que causan enfermedad a los insectos son denominadas entomopatógenas, si estas son capaces de atacar plagas de insectos dañinas para el hombre, pueden ser una herramienta útil para ser tratadas y desarrollarse como agentes de control biológico, más específicamente como bioinsecticidas (Ibarra, 2017). Actualmente se conocen cerca de 100 especies de bacterias identificadas exopatógenas y endopatógenas de artrópodos (Thacker y Jonathan 2002), pero pocas bacterias entomopatógenas están disponibles en el mercado (Castagnola y Stock 2014; García et al., 2015). Existen bacterias que utilizan toxinas para penetrar o matar al hospedero, las bacterias producen una o varias toxinas que intoxican al hospedero, ya sea cuando invaden al hemocele o al ser ingerida, produciéndole la muerte, también pueden producir sustancias antibióticas que previenen el crecimiento de otras bacterias. Siendo las bacterias productoras de toxinas las más exitosas para su uso como agentes de control de plagas.

1.5.2.1 Clasificación de las bacterias entomopatógenas

Podemos clasificar en dos grandes grupos a las bacterias entomopatógenas. Al primer grupo corresponden las bacterias formadoras de esporas, siendo las más importantes desde el punto de vista del control de insectos las aeróbicas del género *Bacillus*. Al segundo grupo corresponden las bacterias no formadoras de esporas, dentro de las cuales se encuentran las bacterias del género *Serratia*. En los últimos años, varias especies de bacterias patógenas han sido aisladas, se han desarrollado como pesticidas y utilizado con éxito en el control biológico de insectos en todo el mundo (Demir et al., 2012). Las bacterias más virulentas se introducen a los hospederos cuando estos comen alimento contaminado. Estas bacterias se multiplican en el aparato digestivo de los insectos, produciendo algunas enzimas (como la lecitinasa y las proteinasas) y toxinas, que dañan las células del intestino medio y facilitan la invasión del hemocele del insecto (Ibarra, 2017). Los pasos que siguen a la infección varían según el tipo de bacterias. Habitualmente, una vez que invaden el hemocele, se multiplican y matan al hospedero por septicemia, por la acción de toxinas o por ambos. En numerosos casos, poco tiempo después de la ingesta del entomopatógeno, o bien, antes de morir, el insecto huésped pierde el apetito y deja de alimentarse. En otras ocasiones los hospederos infectados pueden

defecar o vomitar, distribuyendo con esto el organismo entomopatógeno. Algunas bacterias infectan a la progenie de los insectos ya sea en los huevos o dentro de estos, tal como el caso de *S. marcescens* Bizio en la langosta café *Locustana pardalina* (Nava-Perez et al., 2012).

Las bacterias formadoras de esporas tienen una mayor ventaja sobre las no formadoras de esporas, aunque las bacterias no formadoras de esporas están ganando mayor importancia como buenas controladoras de artrópodos plaga, debido al potencial que tienen en sus genes que son diferentes a los de Bt y que además brindan un mayor espectro de acción frente a artrópodos (Chattopadhyay et al., 2017; Ibarra, 2007).

1.6 ¿Qué son, y para qué sirven los factores de virulencia?

Las bacterias patógenas de mamíferos e insectos utilizan estrategias comunes y factores de virulencia para lograr la infección y colonización de su hospedador. Se cree que la bacteria es capaz de producir diversos factores de virulencia que pueden actuar a nivel de intestino o a nivel de hemocele en el caso de insectos (Cárdenas-Perea et al., 2014). La patogenicidad es la habilidad relativa del patógeno de producir daño en el hospedador, y se mide por el número de microorganismos necesarios para causar enfermedad, es decir es el grado de virulencia. De igual manera, la virulencia es un factor determinante de la invasión y toxicidad de las bacterias, ya que pueden ser poco virulentas o muy virulentas (CárdenasPerea et al., 2014; Hidalgo, 2001).

Los patógenos bacterianos poseen distintas características que son clave: a) tienen la capacidad de detectar señales de cambios ambientales en el hospedador (pH, presión osmótica, disponibilidad de nutrientes y la temperatura); b) adaptación rápida de su fisiología metabólica entre su estilo de vida libre y del hospedador; c) tienen un arsenal de virulencia que les permite sobrevivir y proliferar durante la infección al huésped (do Vale et al., 2016), por ejemplo la liberación de potentes enzimas cuya función principal es matar a las células inmunitarias del hospedero. La expresión y secreción de toxinas requiere de mucha energía para las bacterias por lo que éstas desarrollan estrategias para modular la expresión, de acuerdo con la etapa de la infección al huésped (Vakulskas et al., 2014).

1.6.1 Factores asociados con la adherencia

Estos factores ayudan a las bacterias a fijarse o adherirse al hospedero, se conocen como factores de adherencia o adhesinas, las cuales son proteínas de pared celular que se fijan a moléculas receptoras específicas sobre las células hospederas (Hidalgo, 2001). Las adhesinas que no están en fimbrias son denominadas adhesinas afimbriales (Gerlach y Hensel, 2007). Dentro del grupo de las adhesinas se encuentran los biofilms, o biopelículas. Las fimbrias también se asocian a las adhesinas ya que son soporte de las mismas, las cuales están encargadas de reconocer a su receptor en la célula hospedera.

1.6.2 Factores asociados a la invasión bacteriana

La invasión bacteriana es un proceso por el cual un microorganismo penetra al citoplasma de células no fagocíticas (células epiteliales o endoteliales). Estos microorganismos se replican dentro de las células, se propagan a células adyacentes y finalmente destruyen a las mismas, dicha invasión puede estar facilitada por factores de virulencia que incluyen: a) la cápsula: algunas cepas de neumococos, meningococos, tienen una cápsula que impide la unión de anticuerpos opsonizantes, y por ello son más virulentos que las cepas no encapsuladas, b) enzimas, las cuales son proteínas bacterianas con actividad enzimática (proteasas, hialuronidasas, neuraminidasas, elastasas, colagenasas) que facilitan la diseminación local en los tejidos, ayudando a los microorganismos invasores a penetrar y atravesar las células eucariontes intactas, lo que facilita su entrada a través de las superficies mucosas, permitiendo a los microorganismos la liberación de toxinas (llamadas exotoxinas), que son moléculas proteicas capaces de causar daño a diferentes formas al huésped. La mayoría de las toxinas se unen a receptores diana específicos en las células, y son producidas por los microorganismos durante el transcurso de la infección, c) la endotoxina asociada con los lipopolisacáridos producido por las bacterias Gram-negativas y que forma parte de la pared celular (Hidalgo, 2001).

1.6.3 Factores asociados con la sobrevivencia celular

Los factores nutricionales que escasean en el entorno de la bacteria limitan su crecimiento. Para la mayoría de las especies patógenas el elemento limitante es el hierro debido a que dicho elemento en su forma libre es muy escaso en la sangre, encontrándose en su mayor

parte ligado a proteínas del huésped. Con el fin de obtener hierro libre, algunas bacterias secretan moléculas denominadas sideróforos, que son compuestos de bajo peso molecular que atrapan (quelan) hierro con alta afinidad, los sideróforos son fundamentales en el éxito o fracaso de microorganismos patógenos para invadir un organismo, o colonizar un ambiente determinado (Aguado-Santacruz et al., 2012). Existen tres tipos principales de sideróforos: catecoles, hidroxamatos y un tercero que es una combinación de ambos. De igual manera existen algunas bacterias que producen toxinas cuando captan concentraciones bajas de hierro. Dichas toxinas causan muerte en células vecinas y liberan hierro, que entonces queda disponible (Sayyed y Patel 2011).

1.6.4 Factores asociados con los sistemas de secreción bacteriana

Los sistemas de secreción constituyen mecanismos de virulencia determinantes en la infección (Cárdenas-Perea et al., 2014). Un sistema de secreción de proteínas es una herramienta importante para que una bacteria sea considerada “un buen patógeno”, todos los sistemas de secreción son muy eficientes en cuanto a la especificidad en la selección de los sustratos, el ensamblaje de la maquinaria de secreción y el movimiento coordinado de macromoléculas a través de hasta 3 bicapas lipídicas (González-Pedrajo y Dreyfus, 2003). Los sistemas de secreción ayudan a la bacteria en diferentes procesos dentro de la célula huésped como son: la adquisición de nutrientes, la evasión de sus mecanismos inmunitarios y la intoxicación de dichas células (McQuade y Stoc, 2018).

Los sistemas de secreción que poseen las bacterias son nanomaquinas especializadas en enviar proteínas y otras moléculas biológicas al exterior permitiendo a las bacterias interactuar con el medio en que se encuentran (Cabañas-Romero y Huerta-Saquero, 2015). Las bacterias Gram-negativas, han desarrollado estrategias complejas para transferir proteínas a las células eucariontes (huésped) llamados sistemas de secreción. Dichos sistemas son expresados en *Salmonella enterica*, *Shigella*, *Chlamydia*, *Yersinia*, *Photobacterium*, *Xenorhabdus*, *Serratia* y *E. coli* (Molina, 2015; Sayyed and Patel 2011). Muchos patógenos causan enfermedad a un número reducido de hospederos, como consecuencia de una larga historia co-evolutiva y el desarrollo de factores de virulencia específicos del huésped. Sin embargo, numerosos estudios han demostrado la existencia de lo que parecen ser factores de

virulencia universales (Casadevall y Pirofski, 1999) y entre los cuales se encuentran diversos sistemas de secreción.

Debido a su de doble membrana, las bacterias Gram-negativas tienen sistemas de secreción muy elaborados para ser secretadas al medio.

El sistema de secreción tipo I es un sistema dependiente de la vía Sec cuyo proceso no requiere de un péptido señal que ayude a atravesar la membrana citoplasmática, este tipo de secreción proteica se da en un solo paso desde el citosol hasta el exterior celular (González et al., 2003). Es utilizado por una amplia variedad de bacterias para la secreción de diversos factores como pueden ser toxinas, proteasas y lipasas (González et al., 2003).

El sistema de secreción tipo II también es conocido como sistema general de secreción y ocurre en dos etapas. En la primera etapa, la maquinaria sec transloca el sustrato con péptido señal a través de la membrana plasmática; en la segunda etapa, la proteína pierde el péptido señal y adquiere su conformación nativa en el espacio periplásmico, solo se encuentra en proteobacterias, en especies simbiotes obligadas (González et al., 2003).

El sistema de secreción tipo III cuenta con la función principal de transportar proteínas efectoras del citosol bacteriano a la célula hospedera, que una vez translocadas, intervienen en la alteración del metabolismo celular, dicho sistema se encuentra en bacterias Gram negativas patógenas que interactúan con plantas y animales (Cabañas et al., 2016).

El sistema de secreción tipo IV consiste en 12 componentes denominados VirB11 y VirD4, que transfiere el complejo proteína-DNA en un solo paso del citoplasma hasta la célula eucarionte a través del pilus-T; para esta vía no se requiere de intermediarios periplásmicos, por lo que la secreción es Sec-independiente. Es homólogo a la maquinaria de la conjugación bacteriana y puede transportar tanto DNA como proteínas (Perea et al., 2014).

El sistema de secreción tipo V se le conoce como autotransporte y también utiliza el sistema sec para cruzar la membrana externa; las bacterias que utilizan este sistema de secreción tienen la capacidad de formar una estructura beta barril en su extremo carboxilo, el cual se inserta en la membrana externa y permite al resto del péptido señal, llegar al medio externo. Secreta proteínas grandes de un tamaño de 40 a 400 kDa, las cuales poseen un péptido señal en el dominio N-terminal conservado (Cabañas et al., 2014; Perea et al., 2014).

El sistema de tipo VI carece de secuencias de señalización en el N- terminal, por tanto, presumiblemente no atraviesan la vía Sec, dicho sistema puede liberar proteínas directamente del citosol hacia el espacio extracelular o hacia las células diana. Este sistema de secreción fue inicialmente descrito en *Vibrio cholerae* y *Pseudomonas aeruginosa*, pero en la actualidad se conoce en muchas bacterias Gram-negativas (Gerlach y Hensel, 2007; Rodrigues et al., 2015).

1.6.5 Vesículas de membrana

Las bacterias Gram-negativas liberan vesículas de membrana que interactúan con el hospedero mediante la entrega de factores de virulencia (Sjöström et al., 2015), este proceso ocurre durante el crecimiento normal, varían de 20 a 200 nm de diámetro y están conformadas por lipopolisacáridos, proteínas de la membrana externa y fosfolípidos (Zhou et al., 1998). Estudios de vesiculación revelan el abombamiento de la membrana externa y posteriormente la fisión de vesículas que contienen material denso de electrones, lo que indica que las vesículas se forman por fisión de protuberancias de membrana externa que encierra componentes periplasmáticos (McBroom et al., 2007) ayudan al transporte de varios productos como son enzimas, factores de virulencia, proteínas, DNA y RNA (Bonnington y Kuehn, 2014; Sjöström et al., 2015), la vesícula de membrana podría proveer una ruta disyuntiva para proporcionar factores de virulencia como un factor de secreción. Necesitamos considerar el papel potencial de las vesículas de membrana bacteriana que contienen ADN y ARN en las bacterias hospedadoras y las interacciones bacteria-bacteria.

1.6.6 Biopelículas

Las biopelículas son comunidades de células bacterianas que están incrustadas en una matriz de compuestos poliméricos extracelulares que están unidos a una superficie (Cárdenas-Perea et al., 2014; Costerton et al., 1995). Un aspecto importante de la virulencia de los organismos patógenos es la capacidad de formar biopelículas (agrupación de bacterias unidas a una superficie extraña que puede ser el epitelio del hospedero). Esta matriz protectora puede brindar una barrera para la respuesta inmunitaria, y además es muy recalcitrante a los antibióticos (Li y Wang, 2011).

1.7 Características de la cepa *S. entomophila* A1MO2

Como se ha mencionado, un grupo importante en cuanto a plagas en México son los Coleópteros, quienes han sido difíciles de controlar por sus hábitos rizófagos, sin embargo, a pesar de existir ya 3 productos comerciales a base de bacterias que atacan a larvas de coleópteros (Klein, 1988; Ibarra, 2017), ninguno de estos está disponible comercialmente o es activo hacia larvas de coleópteros que existen en México.

La bacteria de Nueva Zelanda *S. entomophila* A1MO2 (familia *Enterobacteriaceae*) fue aislada del intestino de una larva de la especie *Costelytra zealandica*, nativa de dicho país, y que produce la enfermedad del ámbar. Una vez que la larva ingiere la bacteria, esta coloniza la parte interior del intestino y como resultado hay una inhibición en la alimentación. Una característica de la enfermedad es que la larva adquiere un color ámbar pocos días después de la infección y aproximadamente después de 3 meses muere por septicemia. Mediante estudios realizados para conocer los factores que causan la enfermedad se sabe que hay 3 regiones genéticas codificadas en un megaplásmido (Hurst et al., 2004), las cuales están asociadas con la inhibición de la alimentación: a) locus *amb2*, b) cassette de lisis intacto y c) cluster genético asociado a la inhibición en la alimentación (anti-feeding effect) asociado a un profago defectuoso. Además, tiene otras tres regiones que son consideradas homólogas a un complejo de toxinas insecticidas asociadas a nemátodos y que se encuentran relacionados con dicha enfermedad *sepA*, *sepB* y *sepC*. El plásmido sintetiza dos proteínas: AnfA y AnfB (Núñez-Valdez y Mahanty, 1996), que están involucradas en la actividad tóxica. Como lo señala Jackson en el 2000 la enfermedad del ámbar es altamente específica ya que no ataca a larvas diferentes de *C. zealandica* que solo se encuentra en Nueva Zelanda, lo que indica que *S. entomophila* A1MO2 es incapaz de causar daño y enfermedad en otras especies. En Morelos se ha desarrollado un proyecto a largo plazo para la búsqueda de factores de virulencia o productos bacterianos que sean tóxicos para larvas de *Phyllophaga*. Dentro del proyecto se han aislado cepas de diferentes géneros, que enferman o matan larvas de coleópteros, como son: *B. thurigiensis*, *B. sphaericus*, *S. marcescens*, *Enterobacter spp.* y *Alcaligenes spp* (Núñez-Valdez et al., 2004). Así como una cepa de *S. entomophila* que llamó especial atención debido al antecedente que se tiene de la cepa Neozelandesa.

1.8 Antecedentes generales

1.8.1 *S. entomophila* Mor 4.1 (*SeMor4.1*) cepa mexicana

Pertenece a la familia Enterobacteriaceae, es una bacteria Gram-negativa anaerobia facultativa, no formadora de espora, fermentadora de glucosa y oxidasa negativa, considerada como patógeno oportunista (Núñez-Valdez et al., 2008). La cepa *SeMor4.1* fue aislada del hemocele de una larva de *Phyllophaga* enferma colectada en el estado de Morelos. Dentro de las características importantes de la bacteria es que tanto la bacteria como el sobrenadante de cultivo causan mortalidad e inhibición de la alimentación en larvas de diferentes especies de *Phyllophaga*, por vía oral y de inyección. Mientras que por vía de inyección también causa mortalidad en larvas de Lepidópteros. En la Figura 3 se muestra la mortalidad que causa en larvas de diferentes especies de *Phyllophaga* mediante bioensayos orales.

Cabe destacar que la cepa de Morelos a diferencia de la cepa de Nueva Zelanda no contiene plásmido; lo cual sugiere que tiene distintos factores de virulencia. En el Laboratorio de Patogenicidad Molecular, a cargo de la Dra. Núñez Valdez, es de interés evaluar el potencial de dicha bacteria en el control de insectos plaga, y caracterizar e identificar sus factores de virulencia. Uno de los aspectos fundamentales del estudio de *SeMor4.1* es evaluar la cepa y sus factores de virulencia, en particular toxinas insecticidas, para su utilización de manera individual o en conjunto con otros productos bacterianos con actividad tóxica. Al aislar dichos genes, estos podrán ser evaluados en plantas modificadas genéticamente o ser empleados en el mejoramiento de microorganismos. Una de las más importantes aplicaciones a evaluar, es la posibilidad de utilizar las toxinas identificadas (o sus genes) en conjunto con *B. thuringiensis* (Bt), debido a que actualmente en los mercados se encuentra de manera comercial. Dado que Bt es el bioinsecticida comercial más utilizado en el mundo y que desafortunadamente se han reportado múltiples hallazgos de desarrollo de resistencia (Ibarra, 2017); la propuesta por especialistas es usar dos o más proteínas con el mismo blanco, pero diferente mecanismo de acción y de este modo disminuir el desarrollo de resistencia (Cabrera et al., 2007).

Debido a que *SeMor4.1* no tiene plásmido, ni genes de virulencia asociados a la cepa Neozelandesa, para conocer más acerca de los factores de virulencia se ha seguido un enfoque genómico (Núñez-Valdez et al., 2008).

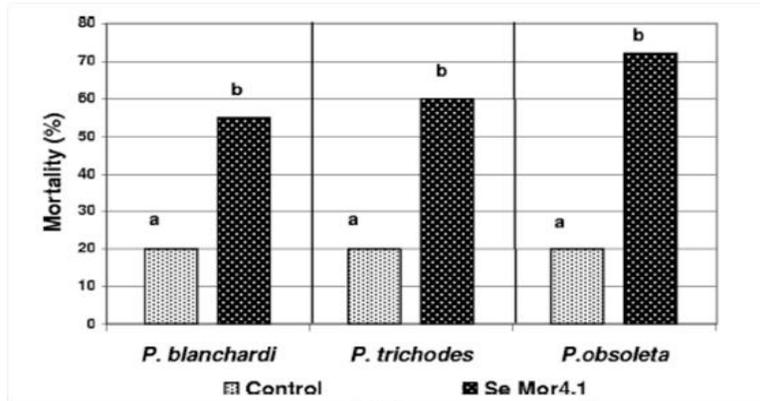


Figura 3 Bioensayos orales multidosis. Realizados en tres especies de larvas que fueron alimentadas por seis días consecutivos con cilindros de zanahoria que contenían 10^8 bacterias de *SeMor4.1*. Los controles fueron alimentados con *S. plymuthica*, ATCC 15928 para *P. blanchardi*, o *Enterobacter* spp no patogénica para los bioensayos con *P. trichodes* y *P. obsoleta* (Tomado de Núñez-Valdez et al., 2008).

1.8.2 Construcción de la genoteca de *SeMor4.1*

Para conocer más acerca de los factores que están involucrados en la virulencia de *SeMor4.1* se construyó una biblioteca genética en *E. coli* (Rodríguez-Segura et al., 2012). El DNA de *SeMor4.1* fue digerido de manera aleatoria, dando como resultado fragmentos de aproximadamente 40 Kb. Dichos fragmentos fueron ligados al vector pCC1FosTM, se obtuvieron diferentes clonas con las cuales se realizaron bioensayos de inyección con 50 µg de sobrenadante concentrado por larva: se seleccionaron aquellas clonas que mostraron actividad tóxica hacia larvas de *Phyllophaga*, obteniendo como resultado las clonas E11, G8, C8, D2 y D5, que fueron capaces de matar a larvas poco tiempo después de la inyección. Como se observa en la Figura 4, las clonas que causaron mayor mortalidad fueron C8 y D2 (90% de mortalidad), E11 y D5 (80% de mortalidad) y la clona G8 (60% de mortalidad), mientras que la cepa *SeMor4.1* causó una mortalidad del 100% después de 4 días del bioensayo, dicha cepa fue utilizada como control positivo y en cuanto a los controles negativos se utilizó medio LB y la cepa de *E. coli*.

Se realizaron digestiones con la enzima BamHI, se pudo observar que los patrones de digestión son diferentes entre las clonas (Figura 5), lo que sugiere que la actividad tóxica está

asociada a distintas regiones genéticas (Rodríguez-Segura et al., 2006; Rodríguez Segura et al., 2012).

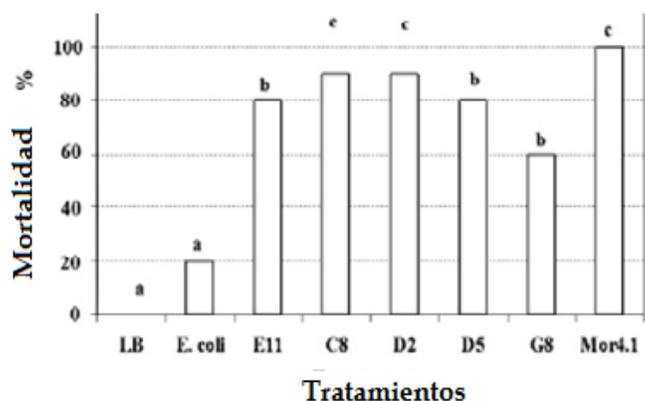


Figura 4 Mortalidad de larvas de *Phyllophaga*. Bioensayo de inyección de las clonas con actividad tóxica: E11 con 80%, C8 con 90%, D2 con 90%, D5 con 80% Y G8 con 60% de mortalidad, como controles negativos se utilizó LB y *E. coli* y como control positivo *SeMor4.1* (Tomado de Rodríguez-Segura et al., 2012).

1.8.3 La clona C8

En el laboratorio de Patogenicidad Molecular se están trabajando varios proyectos para la caracterización de los genes de virulencia. En este trabajo en particular se profundizó en el estudio de la clona C8. En estudios anteriores la clona fue secuenciada para identificar los probables genes asociados a la actividad tóxica (Figura 6; Núñez-Valdez et al., en preparación). Esta secuencia contiene 37 posibles marcos de lectura abiertos (ORFs), distribuidos en 19 unidades de transcripción, de los cuales 7 son operones (Díaz-Sánchez, 2014).

Para poder determinar cuáles son los factores que están asociados a la toxicidad se construyeron subclonas en el vector pBluescript II Sk + (Stratagene) y se obtuvieron 4 subclonas: F2, F3, F5, F16 (Tabla 1), las cuales fueron evaluadas por bioensayos con insectos para poder determinar que genes están involucrados en la actividad tóxica (Núñez-Valdez et al., en preparación).

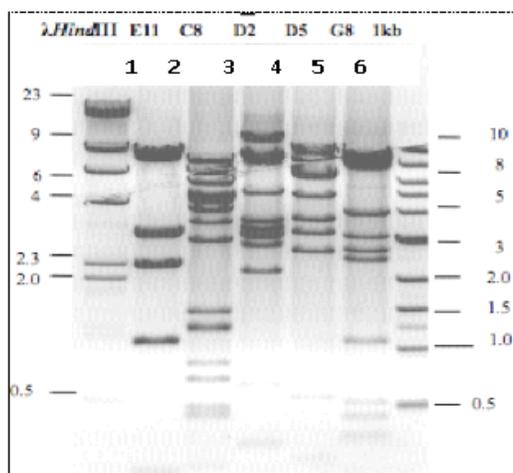


Figura 5 Digestión con BamHI en clonas con actividad tóxica. Gel de agarosa al 1%. Carril 1 y 7 MPM, carriles 2, 3, 4, 5, 6 clonas con actividad tóxica en *Phyllophaga* E11, C8, D2 D5 y G8 digeridas con enzima BamHI, donde se observa un patrón de bandas diferente entre cada clona (Tomado de: Rodríguez-Segura et al., 2006).

Se realizaron bioensayos de inyección con las nuevas subclonas obtenidas (F2, F3, F5 y F16) y se identificó a la subclona F3 como la responsable de la actividad tóxica como se observa en la Figura 7. Se mostró que las clonas C8 y F3 causaron mortalidad al ser inyectadas con aproximadamente 10^4 bacterias/larva. ($n=14$, X^2 , $P<0.05$), donde C8 genero una mortalidad del 45% y F3 del 100% 24 horas después de ser inyectadas (Díaz-Sánchez, 2014). La clona A1 es una cepa control sin actividad insecticida que proviene de la genoteca de *SeMor4.1* (Rodríguez-Segura, et al., 2012).

Tabla 1 Subclonas obtenidas a partir de la clona de C8

Subclonas de C8	Coordenadas dentro de C8	Tamaño del Fragmento
F2	5376-11942	6566 pb
F3	28958-34549	5591 pb
F5	14218-18823	4605 pb
F16	19969-20664	695 pb

(Tomado de: Díaz-Sánchez, 2014)

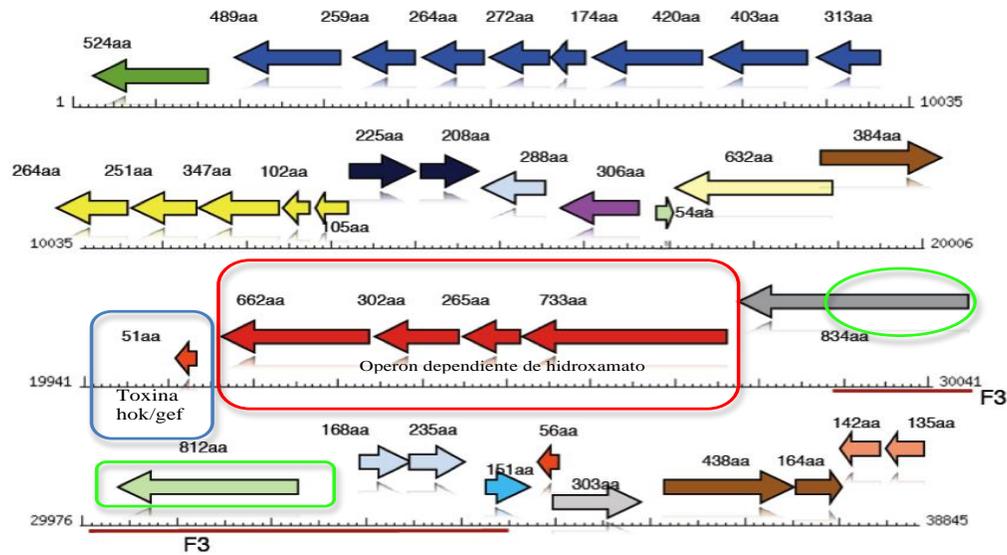


Figura 6 Mapa de la secuencia de la clona C8. Se muestra la posición de la subclona F3 indicada por una línea de color rojo bajo la escala, adicionalmente se señalan las secuencias que se sugiere codifican para los elementos tóxicos de la clona F3: un fragmento que codifica para PBP 1b (proteína de unión a penicilina) indicada por un ovalo verde, y una región que codifica para una RNA helicasa dependiente de ATP (rectángulo verde) (Tomado de: Díaz-Sánchez, 2014).

Con este trabajo se concluyó que tanto la bacteria como el sobrenadante de C8 confieren actividad tóxica hacia larvas de *Phyllophaga spp*, por vía de inyección; sin embargo, no tiene actividad tóxica por vía oral (Díaz-Sánchez, 2014).

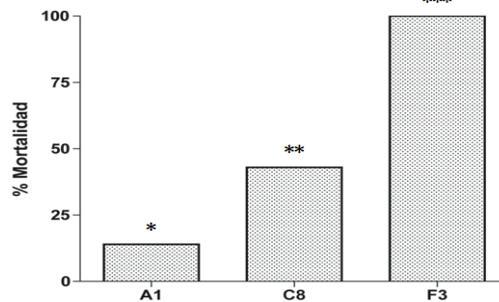


Figura 7 Porcentaje máximo de mortalidad obtenido en larvas de tercer estadio. 24 horas después de ser inyectadas con aproximadamente 10^4 bacterias/larva. (n= 14, X^2 P<0.05). Los asteriscos sobre las barras indican si existen diferencias estadísticas significativas (Tomado de: Díaz-Sánchez 2014).

1.9 Antecedentes Directos

1.9.1 La subclona C8-F3

La secuencia de la subclona C8-F3 corresponde a la región 28958-34549 de la clona C8 y codifica dos genes principales, una RNA helicasa dependiente de ATP HrpB (RNA Hel) y la región N-terminal de la proteína PBP 1b; dicho dominio de PBP tiene actividad glicosil-transferasa (gt-PBP). La región genética codifica para productos que no presentan homología con factores que intervengan de manera directa en la virulencia y la patogenicidad de bacterias que anteriormente hayan sido reportados en otros sistemas hacia insectos. Como resultado de los bioensayos de inyección mostrados anteriormente, esta clona presenta actividad tóxica en larvas de tercer estadio del género *Phyllophaga* (Díaz-Sánchez, 2014).

1.9.2 Mutantes a partir de la subclona C8-F3

En trabajos realizados en el laboratorio (Díaz-Sánchez, 2014) se construyeron dos mutantes por delección a partir de la subclona C8-F3 con el fin de determinar cuál de las dos proteínas están implicadas en la actividad tóxica. La construcción de $\Delta B1$, se realizó por una delección en la región que codifica para la RNA-HEL, el tamaño del fragmento deletado fue de 608 pb; en dicha mutante se dejó trunca la RNA-HEL. La construcción $\Delta E9$, contiene solo un fragmento de 1166 pb de una secuencia total de 2502 pb correspondiente a la clona F3 y codifica únicamente para la proteína gt-PBP, puesto que utiliza un codón de termino que está presente en la secuencia del vector (Díaz-Sánchez, 2014).

Posteriormente en los bioensayos de inyección con sobrenadantes de cultivo de las mutantes realizadas con una dosis de 50 μ g por larva, se observa que ambas mutantes mostraron disminución en la actividad tóxica con respecto de la subclona original F3 de donde provienen las clonas $\Delta B1$ y $\Delta E9$ (Figura 8). Estos resultados sugieren que ambas proteínas están asociadas a la actividad tóxica, sin embargo, la evidencia es genética, por lo que se requieren más estudios para determinar si efectivamente ambas proteínas, de manera directa, provocan actividad insecticida en insectos.

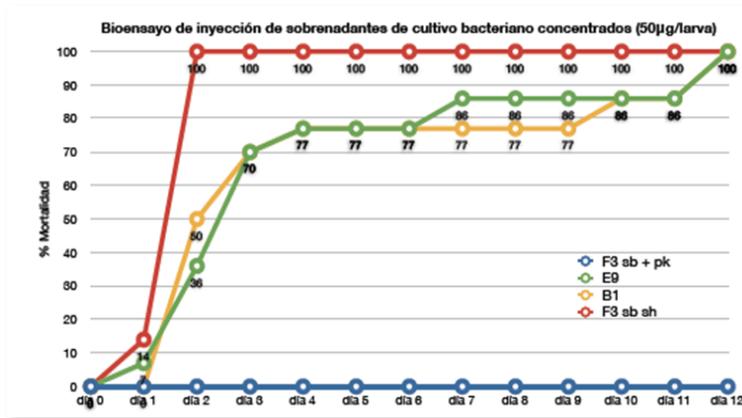


Figura 8 Mortalidad observada del día 1 al día 12 del bioensayo. Se muestra el porcentaje de mortalidad con respecto al tiempo del bioensayo, con larvas de tercer estadio inyectadas con sobrenadantes concentrados (n=14) (X^2 , $P < 0.05$). Se utilizó como control negativo sobrenadante de cultivo de la clona C8-F3 tratado con proteinasa K (F3+Pk) y como control positivo sobrenadante concentrado de la clona F3 sin tratar (C8-F3 Sb-H) (Tomado de Díaz-Sánchez, 2014).

1.9.3 Las proteínas PBP

Las PBP reciben el nombre de Proteínas de Unión a Penicilinas (Por sus siglas en inglés Penicillin Binding Proteins) y participan en los últimos pasos de la síntesis de peptidoglicano. Las bacterias Gram-negativas y Gram-positivas tienen en su pared celular un andamiaje de polímeros entrecruzados de peptidoglicano, esta molécula está constituida por una porción uniforme de glicano formado por dos derivados de azúcares, acetilglucosamina (GlcNAc) y acetilmurámico (MurNAc), y un pequeño grupo de aminoácidos (aa); dichos componentes se unen para formar la estructura que se repite a lo largo de la pared denominada *tetrapéptido del glicano*, el cual se observa en la Figura 9 de la izquierda (Pink et al., 2000).

1.9.3.1 ¿Cuál es la función de las proteínas PBP?

Son las responsables del ensamble, mantenimiento y regulación del peptidoglicano (PG; Denome et al., 1999). Las PBPs están presentes en casi todas las bacterias, pero varían de tamaño y afinidad. La mayoría de estas proteínas están ancladas a la membrana interna de la membrana bacteriana con sus sitios activos disponibles en el espacio periplásmico (Sauvage y Terrak, 2016). Las proteínas PBPs tienen diferentes funciones: hidrólisis, transpeptidación, transglicosilación y carboxipeptidación (Young, 2001). Están implicadas

en la fase final de la formación de la pared celular: la transpeptidación entre las cadenas de glucopéptidos que produce la formación de puentes peptídicos entre cadenas de mureína adyacentes. Las proteínas PBP también tienen la función de reorganizar la pared durante el crecimiento y la división celular (Sauvage y Terrak 2016).

Las PBPs sufren modificaciones al entrar en contacto con la penicilina, ya que al unirse la penicilina covalentemente con sus sitios activos estas se vuelven inestables e inactivas, como resultado de ello se pierde la viabilidad (Ramachandran et al., 2006). Sin embargo, algunas bacterias con el paso del tiempo han modificado las estructuras de las PBPs para verse menos afectadas y así ser menos susceptibles frente a la acción de los antibióticos β -lactámicos.

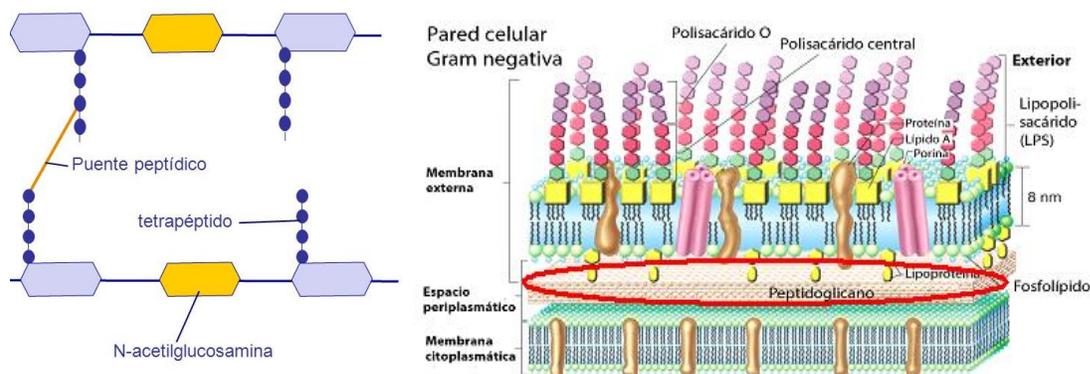


Figura 8 Tetrapéptido de glicano (izquierda), pared celular de bacteria Gram-negativa (derecha). En la figura (izquierda) se muestra el puente peptídico que forma el tetrapéptido de glicano, y la unión de esta forma el peptidoglicano donde las PBP interfieren. En la figura (derecha) Se indica la membrana externa, el espacio periplásmico el cual está formado de peptidoglicano (en ovalo rojo) y la membrana citoplasmática (Tomado de: <https://estructurayfuncioncelular>).

1.9.3.2 Clasificación de las proteínas PBP

Las PBPs pueden dividirse básicamente en tres grupos, las monofuncionales o de bajo peso molecular, las multimodulares o de alto peso molecular y las β lactamasas. Dependiendo de su estructura primaria y del dominio las PBPs de alto peso molecular se pueden clasificar en clase A y B, así como de la actividad catalítica de su dominio N-terminal (Sauvage y Terrak 2016).

La PBP encontrada en *SeMor4.1* es de alto peso molecular; por ello en este trabajo describiremos las PBPs de alto peso molecular de la clase 1B. Estas proteínas tienen una

estructura multidominio y exhiben en un sitio la actividad de transpeptidación que cataliza el entrecruzamiento del peptidoglicano; en otro exhiben la actividad de transglicosilación que participa en el alargamiento de las cadenas de glicano conocido como el módulo que no une penicilina (Egan *et al.*, 2018; figura 10). Además de los dos dominios catalíticos, la estructura cristalina de PBP 1B reveló la presencia de un pequeño dominio no catalítico llamado UB2H (Sung *et al.*, 2009; King *et al.*, 2016).

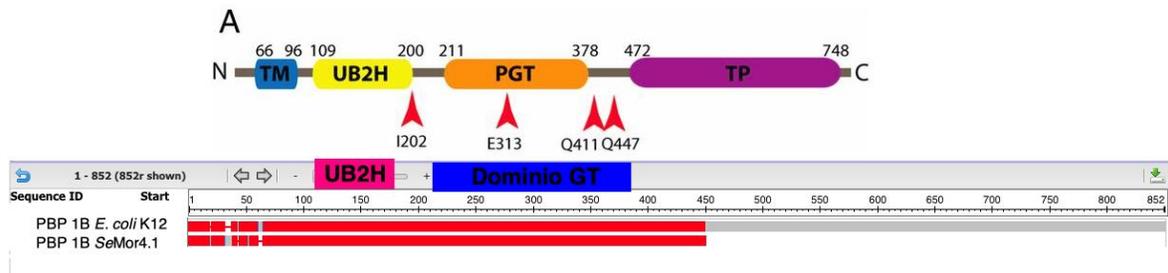


Figura 10 Alineamiento de PBP 1B de *E. coli* K12 y PBP 1B de *SeMor4.1*, en la parte superior se encuentra la PBP de *E. coli* que tiene un tamaño de 852 aa, y en la parte de abajo se encuentra el dominio gt-PBP 1B de *SeMor4.1*, debido a que en *SeMor4.1* solo se tiene un aproximado a 450 aa este se logró alinear solo hasta la mitad (en color rojo) y parte no alineada con nada se representa en color gris. En la parte superior se muestran los dominios para una PBP 1B, por lo tanto, en nuestra secuencia de *SeMor4.1*, se comprueba que tenemos el dominio UB2H y el dominio glicosil-transferasa intactos.

En *E. coli*, y presumiblemente otras bacterias Gram-negativas, el crecimiento del péptidoglicano principalmente de una sola capa está regulado por lipoproteínas ancladas a la membrana externa. La lipoproteína LpoB se requiere para activar PBP 1B, que es una PG sintasa bi-funcional principal con polimerización de la cadena de glucano (glicosil-transferasa) y reticulación de péptidos (actividades de transpeptidasa; Egan et al 2018), por lo que es importante localizar el dominio UB2H (Figura 12) ya que dicho dominio es necesario para activar la PBP 1B, y de acuerdo al alineamiento realizado con otra PBP 1B de *E. coli* de la cepa K12, para poder localizar tanto las diferencias que estas tienen entre sí como las regiones en donde se encuentran los dominios, en donde comprobamos que, en la clona F3, tenemos la presencia del dominio UB2H (109-200 aa) y el dominio gt-PBP (211-378 aa).

1.9.3.3 El dominio GT-PBP de *SeMor4.1*

Se sabe que el dominio glicosil-transferasa de las PBPs está implicado en catalizar el alargamiento de las cadenas de glucano no entrecruzadas, además de ello tienen una región hidrofóbica que probablemente media su interacción con la membrana y el sustrato lipídico y son bifuncionales, ya que se han asociado con las funciones de glicosilación y de transpeptidación (Holtje, 1998; Den Blaauwen et al., 2008; Zapun et al., 2008). Toda la información sobre la caracterización de dicho dominio se ha centrado en la actividad canónica que tiene sobre la síntesis del PG; sin embargo, no existen reportes que profundicen sobre otra actividad que tenga dicho dominio.

En la figura 11 se muestra de lado izquierdo una PBP 1B de *E. coli* completa, y se muestra el modelo para la misma, de lado derecho se muestra la región N-terminal de gt-PBP en donde se muestra en color azul la región parecida a *E. coli* y en color gris, la región faltante de transpeptidasa que se encuentra en el C-terminal.

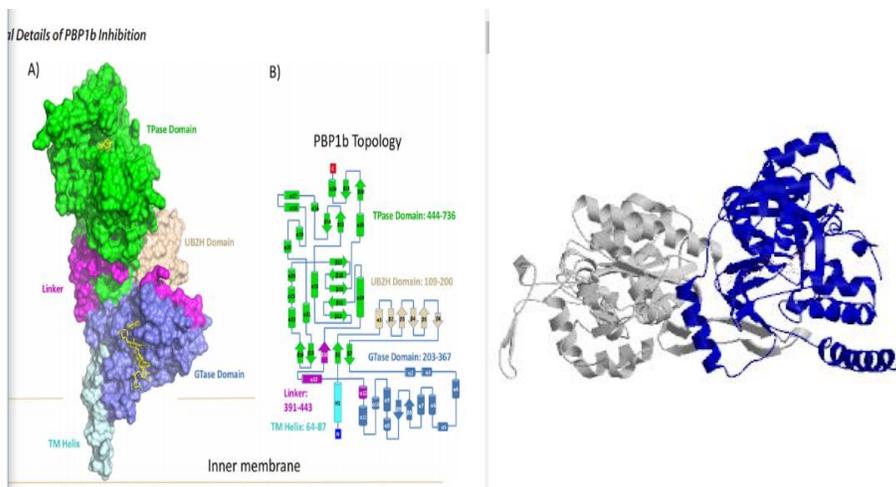


Figura 10 Comparación de PBP 1B de *E. coli* y PBP 1B de *SeMor4.1*. De lado izquierdo la PBP completa de *E. coli* misma que tiene los dominios glicosil-transferasa, trans-peptidasa y el dominio UB2H, de lado derecho la simulación de un modelo realizado en el programa SWISS-MODEL, donde se observa que solo se encuentran dos dominios el trans-peptidasa y el UB2H, la región en color azul corresponde al dominio trans-peptidasa, que la construcción C8-F3 con actividad tóxica no tiene.

Es importante mencionar que la evidencia genética ha sugerido que la actividad tóxica es de origen proteico, ya que dicha actividad es eliminada cuando las muestras son sometidas a altas temperaturas, lo que sugiere una desnaturalización y consecuente pérdida de actividad de la proteína y también cuando se los tratamientos fueron sometidos a la actividad de la

proteínasa K. Se ha sugerido que el dominio GT-PBP de *SeMor4.1* está involucrado en la actividad tóxica en larvas de Lepidópteros y Coleópteros por vía de inyección (Cruz-López, 2015). Por lo tanto, caracterizar la actividad del dominio GT-PBP es de suma importancia para poder determinar si actúa como toxina.

En el laboratorio de Patogenicidad Molecular se ha clonado y expresado el dominio gt-PBP en el sistema de vectores de pQE (QIAGEN); la proteína recombinante etiquetada con 6xHis obtenida como candidato fue purificada en condiciones nativas con una eficiencia aproximada de 4 µg por ml de cultivo como se muestra en la figura 12. Sin embargo, la purificación que se realizó fue en pequeños cultivos no mayores de 15 ml y en condiciones conocidas como Batch (Gorostieta-Nava, 2018), por lo que se espera que al realizar el escalamiento de los cultivos a mayor volumen y la purificación con columnas de afinidad se obtenga un mayor rendimiento de la proteína que sea suficiente para poder realizar bioensayos con insectos.

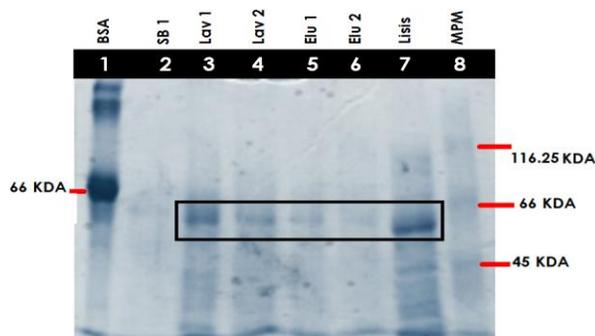


Figura 12 Gel de poliacrilamida 10% Análisis de fracciones bajo condiciones nativas. Carril 1) BSA; carril 2) SB 1 después de la unión a la resina; carril 3) Lavado 1 (pH 8, 20 mM imidazol); carril 4) Lavado 2 (pH 8, 20 mM imidazol); carril 5) Elución 1 (pH 8, 250 mM imidazol); carril 6) Elución 2 (pH 8, 250 mM imidazol); carril 7) Lisis total; carril 8) Marcador de peso molecular (Gorostieta-Nava, 2018).

1.10 La proteína RNA helicasa dependiente de ATP

Dentro de la subclona C8-F3 se encuentra codificada otra proteína, la RNAHel. De acuerdo con estudios previos de laboratorio se sugiere que también está implicada en la actividad tóxica hacia larvas del insecto *Phyllophaga* (Díaz-Sánchez, 2014). Las RNA helicasas dependientes de ATP son enzimas presentes en todos los reinos que catalizan la separación de ácidos nucleicos bicatenarios (dsRNA), de manera dependiente de energía, (Cordin et al., 2006; Granato, 2016). Utilizan el cambio de energía libre de unión e hidrólisis de un

nucleótido trifosfato para disociar RNA dúplex o desplazar proteínas unidas (Vakulskas et al., 2014). Las RNA-HEL han sido implicadas en infecciones de protozoos, bacterias y hongos; se ha observado que acompañan a los RNAm desde la transcripción hasta el procesamiento, transporte y traducción (Steimer y Klostermeier, 2012). Debido a su papel central, el mal funcionamiento de las RNA-HEL a menudo conduce a la enfermedad (Steimer y Klostermeier, 2012). Los motivos de las helicasas parecen estar organizados en un dominio central que proporciona la función catalítica, mientras que las inserciones opcionales y las secuencias amino y C-terminal pueden comprender dominios distintos con diversos roles accesorios (Gorbalenya y Koonin, 1993).

Las RNA helicasas se agrupan en superfamilias según los dominios conservados compartidos, la mayoría pertenece a las familias DEAD-box (también DEAH-box) y DEXH-box. De manera general comparten un núcleo tridimensional similar en la estructura, compuesta por dos dominios RecA enlazados de forma flexible. Dentro de cada familia, los motivos de la helicasa conservados específicos se encuentran en una disposición tridimensional similar en la estructura central, donde contribuyen a la unión de ATP e hidrólisis, unión de ARN y desenrollamiento de ARN. En muchas helicasas, el núcleo está flanqueado por extensiones N- y/o C-terminales.

Cabe destacar que se ha realizado una búsqueda de los motivos de que tiene la RNA-HEL de *SeMor4.1* que se muestran en la Figura 13. RNA-HEL de *SeMor4.1* pertenece a la familia SF2 (DEAD-box) ya que contiene el motivo mencionado.

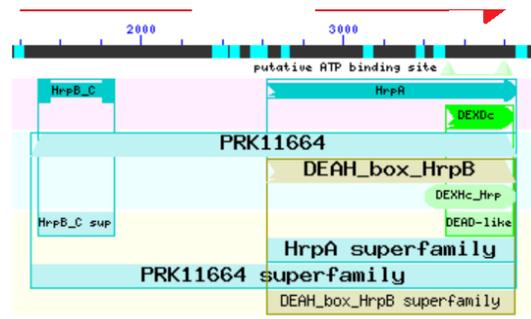


Figura 13 Análisis de la RNA-HEL de *SeMor4.1*, En el centro (línea negra) se señala el sitio de unión de ATP, en la parte interior en el C-terminal del gen se encuentra el motivo DEAD-box.

Las helicasas DEAD-box, llamadas así por el motivo de aminoácidos conservados D-E-A-D (Iost y Dreyfus, 2006), son la familia más grande de las RNA-HEL (Steimer y Klostermeier, 2012). Se ha demostrado la participación de estas durante la maduración y degradación del ARN en *E. coli*, *B. subtilis* y *S. aureus* donde también se ha demostrado que se asocian con componentes del degradosoma de ARN. A pesar del hecho de que las helicasas DEAD-box se han relacionado con factores de virulencia bacteriana, como con el sistema de secreción tipo tres y la formación de biopelículas, la medida en que influyen en la expresión génica, así como sus mecanismos, permanecen en gran parte inexplorados (Vakulskas et al., 2016). Las helicasas bacterianas DEAD-box se consideran principalmente importantes para mantener la estabilidad de la estructura secundaria del ARN bajo condiciones de temperatura ya que tienen el mayor efecto a bajas temperaturas y bajo condiciones de estrés adversas; además las helicasas DEAD-box desempeñan un papel muy importante en la regulación postranscripcional (Genin et al., 1992; Vakuskas et al., 2016).

1.10.1 Papel de las helicasas DEAD-box en la patogenicidad

Varios estudios sugieren que las helicasas DEAD-box pueden jugar un rol importante en infecciones en general, ya que se han visto implicadas con diferentes patógenos que causan graves enfermedades en humanos (Díaz et al., 2000). Por ejemplo en el cáncer gástrico; la helicasa DeaD de *Helicobacter pylori* participa en la regulación positiva de la actividad de la ureasa que se asocia con diversos tipos de cáncer (Bijlsma et al., 1999; Kusters et al., 2006). La bacteria *Listeria monocytogenes* es el agente causante de la Listeriosis, con actividad hemolítica; estudios han revelado que la cepa que carece de la RNA helicasa DExD-box disminuyó la actividad hemolítica en comparación con el tipo silvestre (Netterling et al 2015). Por otra parte, recientemente se ha demostrado que las proteínas que contienen los genes del tipo *hrp* (RNA helicasas) comparten similitud con los determinantes de patogenicidad de bacterias del género *Yersinia*, patógenas a mamíferos y por analogía, podrían estar involucradas en un sistema de secreción tipo III específico de las funciones de patogenicidad (Gough et al., 1992). El sistema de secreción T3SS consiste en un aparato que libera una serie de proteínas efectoras a través de la membrana interna, el espacio periplásmico y la membrana externa de las bacterias hacia el citoplasma de las células eucariotas (Grant, et al., 2006; Schmidt, et al., 2012). Otros estudios han demostrado que el

dominio *hrpB* de *Xanthomonas citri* subsp *citri* está asociado con efectos sobre la formación de biofilms (Granato, 2016; Li y Wang, 2011). En la figura 13 se muestra la presencia de HrpA de DEAH-box, mismo que está implicado en la enfermedad de Lyme/Borreliosis causada por la espiroqueta *Borrelia burgdorferi*; su homólogo en *E. coli* está involucrado en el procesamiento de ARNm, lo que sugiere un papel importante de HrpA en la infección (Salman-Dilgimen et al., 2011).

2. Justificación

Actualmente el control biológico y los bioinsecticidas nos brindan una alternativa para contrarrestar los daños causados por las plagas de cultivos. Recientemente, gracias a las nuevas tecnologías en la aplicación de la ingeniería genética, es posible evaluar genes cuyos productos causen enfermedad o mortalidad en insectos plagas con el fin de usar en un futuro este conocimiento para mejorar cultivos y protegerlos de plagas específicas. También se puede utilizar este conocimiento para desarrollar bioinsecticidas que sean amigables con el ambiente.

En el Laboratorio de Patogenicidad Molecular se han aislado 5 clonas con actividad tóxica hacia larvas de *Phyllophaga*. La clona C8 presentó un alto grado de actividad toxica causando 90% de mortalidad.) La búsqueda de subclonas insecticidas de C8 para restringir las regiones genéticas asociadas a dicha toxicidad, arrojó como resultado a la subclona C8-F3 como la causante de la actividad tóxica. De acuerdo con la evidencia mostrada de las mutantes de C8-F3, la RNAHel y el dominio gt-PBP participan en la actividad tóxica en larvas de *Phyllophaga*. Sin embargo, la evidencia obtenida es genética; para obtener evidencia proteica, se requiere purificar ambas proteínas y evaluar su efecto mediante ensayos de inyección en larvas de *Phyllophaga* y/o *Spodoptera frugiperda*.

3. Hipótesis

La proteína RNA-HEL y el dominio GT-PBP, provenientes de la bacteria entomopatógena *SeMor4.1* tienen actividad tóxica hacia larvas de *P. blanchardi* y/o *S. frugiperda*.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Estudiar y caracterizar la actividad tóxica de la proteína RNA-HEL y el dominio GT-PBP, de la cepa *SeMor4.1* en larvas de *P. blanchardi* y/o *S. frugiperda*.

4.1.1 Objetivos particulares

1. Clonar el gen de la RNA-HEL, en el vector de clonación pBluescript SK+ y probar su actividad en larvas de *Phyllophaga sp.*
2. Clonar y expresar el gen de la RNA-HEL y el dominio GT-PBP, en un sistema de expresión.

5. Materiales y métodos

5.1 Cepas y cultivos

La subclona C8-F3 fue obtenida del Laboratorio de Patogenicidad Molecular, perteneciente al Centro de Investigación en Dinámica Celular (CIDC), de la Universidad Autónoma del estado de Morelos (UAEM).

Las células electrocompetentes utilizadas fueron guardadas a -70 °C: Cepa EPI300™ de *E. coli* (Epicentre) es una célula huésped utilizada para ser transformada con el vector de clonación pSK+ que confiere resistencia a ampicilina (100 µg/ml). Cepa M15 de *E. coli* (pREP-4) es una célula huésped para ser transformada con el vector de expresión pQE-31, misma que tiene el plásmido pREP-4 que tiene un tamaño de 3740 pb, que le confiere resistencia a kanamicina (25 µg/ml).

A continuación, en la tabla 2 se describen las cepas, clonas y los plásmidos que se utilizarán en este proyecto; así como sus características más importantes.

5.1.1 Cultivo de bacterias

Las cepas de *E. coli* se incubaron a 37 °C, en medio Luria Bertani (LB) líquido y sólido (ver anexo 1), con los antibióticos adecuados según la resistencia que confieren los plásmidos

pSK+ y pQE-31, como lo son ampicilina (100 µg/ml). También se adicionaron Xgal (25 µg/ml) e IPTG (25 µg/ml), en el caso de la selección de transformantes dado por el sistema de lacZ en el vector de clonación pSK+.

5.1.2 Enzimas

Las enzimas que se utilizaron en este proyecto son de Thermo Scientific™, siguiendo las especificaciones según proveedor (Thermo Fisher Scientific™).

Tabla 2 Cepas, clonas y plásmidos

Cepas	Características importantes	Referencia
<i>E. coli</i>		
<i>E. coli</i> EPI300™	Célula huésped transformada en la genoteca de <i>S. entomophila</i>	Epicentre
<i>E. coli</i> M15™ (pREP4)	Célula huésped transformada en la construcción de gt-PBP y Hel para ser expresada , Amp ₁₀₀ , Km ₂₅ .	QIAGEN
Clonas		
C8	<i>E. coli</i> EPI300™ /pCC1FOS™ , Clona que proviene de la genoteca de <i>S. entomophila</i> Mor4.1, Amp ₁₀₀ , Cln _{12.5} ,	En estudio (Rodríguez-Segura, et al., 2012)
F3	<i>E. coli</i> EPI300™, subclona de C8, Amp ₁₀₀ .	En estudio (Rodríguez-Segura, et al., 2012)
p31-GT-PBP	<i>E. coli</i> M15™, subclona de F3, contiene el dominio glicosil-transferasa, Amp ₁₀₀ , Km ₂₅	En estudio (Gorostieta-Nava, et al., 2018)
Plásmidos		
pBluescript SK+	Vector usado para la construcción pSKPBP, Amp ₁₀₀ .	Stratagene
pQE-31	Vector usado para la construcción de GT-PBP y Hel, Amp ₁₀₀	QIAGEN
pET-22b(+)	Vector usado para la construcción de GT-PBP y Hel, Amp ₁₀₀	Novagen

Amp: Ampicilina, Cln: Cloranfenicol, Km: Kanamicina

5.2 Aislamiento del gen de RNA-HEL a partir de C8-F3

5.2.1 Preparación de ADN plasmídico por método de lisado alcalino

Día 1, se sembraron por agotamiento las clonas de interés en caja de LB, suplementado con los antibióticos requeridos de la clona con la que se va trabajar, se incubó O/N a 37 °C.

Día 2, se tomó una colonia grande (preferentemente) y fue sembrada en tubo (5ml LB: 5 μ l Amp) mismo que se incubó 24 horas, 250 rpm a 37 °C. Día 3, se crecieron 100 ml de LB + amp 100 μ g/ml, con 100 μ l del preinóculo del plásmido del día anterior. Se tomó el inóculo y fue centrifugado a 4 629 x g, 10 min a 4 °C. El botón celular fue resuspendido en 2 ml de solución I (ver anexo 2), dejando 10 min en hielo. Posteriormente se adicionaron 4 ml de solución II preparada en fresco (ver anexo 8), y fue mezclado por inversión dejando 5 min en hielo. Se continuo adicionando 4 ml de solución III (ver anexo 9), y mezclado por inversión y fue congelado 30 min a -20 °C. Se centrifugo 30 min a 12 857 x g a 4 °C, el sobrenadante fue tomado y precipitado con 9 ml de Isopropanol, posteriormente fue incubado 20-30 min a TA. Finalmente fue centrifugado nuevamente 30 min a 12 857 x g a 4 °C, el sobrenadante fue descartado. La pastilla fue resuspendida suavemente en 2 ml de buffer TE (de un total de 100 ml de cultivo, para continuar con el método de cloruro de litio).

5.2.2 Extracción de plásmido por método de cloruro de litio y extracción fenólica

El equivalente de 100 ml de cultivo fue llevado a 2 ml con buffer TE y colocado a 90 °C por 20 segundos, posteriormente se adicionaron 2 ml de LiCl 5 M (ver anexo 10). Se dejó 5 minutos en hielo y centrifugo 15 minutos a 12 857 x g a 4 °C. Al sobrenadante se le adicionaron 10 ml de etanol absoluto y se centrifugo 15 minutos a 8 228 x g a 4 °C. Después se realizó un lavado con etanol al 80% frío y fue sometido nuevamente a una centrifugación bajo las mismas condiciones. Los tubos se incubaron 15 minutos a 37 °C; para secar la pastilla y eliminar el etanol contaminante y fue resuspendido en 0.5 ml de buffer TE con 2 μ l de RNAsa (40 μ g/ml) durante 15 minutos a 37 °C, esto para eliminar los restos de ARN. Posteriormente se adicionaron 0.5 ml de PEG (ver anexo 11), y se centrifugaron a 12 857 x g a 4 °C durante 15 minutos se eliminó el sobrenadante, y finalmente se adicionaron 150 μ l de buffer TE. Se continuó con una extracción fenólica agregando 1 vol. (150 μ l) de fenol, se centrifugo a 15 700 x g a TA durante 3 min, tomando la fase orgánica. Después fue adicionado 1 vol. de una mezcla de cloroformo: alcohol Isoamílico (24:1) y se dieron dos pulsos en el vórtex. Se continuo centrifugando a 15 700 x g durante 5 minutos y se volvió a tomar la fase orgánica, se adiciono 1 vol. de acetato de amonio y 2.5 vol. de etanol absoluto frio (-20 °C) para precipitar el DNA, finalmente fue centrifugado a 15 700 x g a 4 °C durante

30 min y se realizaron 2 lavados con etanol 80% frío para eliminar las sales, posteriormente se dejó secar a 37 °C, y se resuspendió la pastilla con el DNA deshidratado con 100 µl de agua libre de nucleasas.

5.2.2.1 Cuantificación de ADN

Se utilizó el espectrofotómetro Biodrop para cuantificar el ADN, midiendo la absorbancia de luz ultravioleta (UV) a una longitud de onda de 260 nm, utilizando como blanco agua ultrapura. El ADN se cuantificó en un volumen de 1 µl.

5.2.3 Preparación vector-inserto (RNA-HEL) a partir de C8-F3

Primeramente, se realizó una digestión con la enzima EcoRI seguida de una digestión con la enzima SmaI. Como resultado de estas digestiones se obtuvo el inserto de interés con un tamaño de 2743 pb, flanqueado en el extremo 5' con EcoRI y el extremo 3' con SmaI con dichas digestiones se mantiene el ATG propio de la proteína junto a su promotor además de su codón de paro como se muestra en la Figura 14.

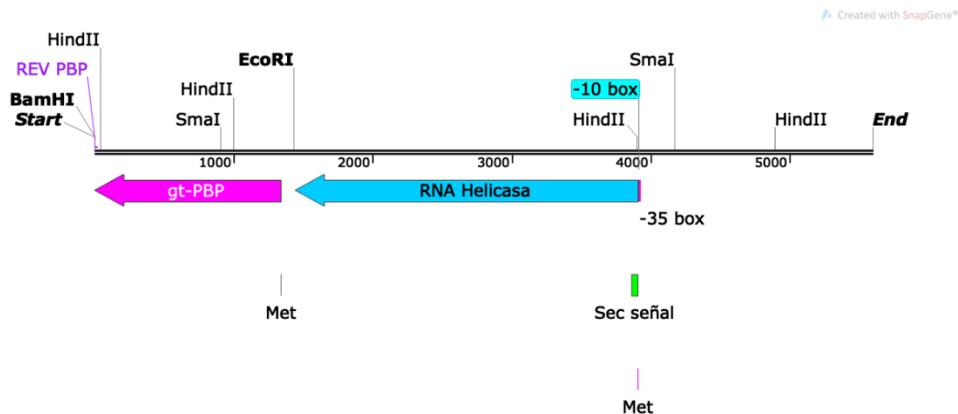


Figura 14 Preparación del inserto a partir de C8-F3. Se muestra el tamaño de la subclona C8-F3 que tiene un tamaño de 5 93pb, en la línea roja se señala el lugar en donde se encuentra el gen de la RNA-HEL dentro de C8-F3, además se señalan los sitios de restricción de las enzimas que fueron utilizados.

5.2.3.1 Protocolo de digestiones para preparación del inserto

Para todas las reacciones de digestión se realizó el mismo protocolo. Se realizó una reacción de digestión en un volumen final de 20 μ l, se adiciono 12 μ l de H₂O (libre de nucleasas) + 2 μ l de buffer EcoRI 10X + 5 μ l de DNA (500 ng) + 1 μ l de la enzima EcoRI. La reacción se incubó 1 hora a 37 °C, posteriormente se tomaron 2 μ l de la digestión para corroborar la digestión en un gel de agarosa al 1% (se espera una banda de 3 Kb que corresponde al peso del vector de clonación lineal).

Debido a que se realizó una doble digestión continuamos con la inactivación de la enzima.

Para esto se colocó a

a 65 °C en tubo eppendorf durante 20 min (cada enzima tiene una temperatura de inactivación de acuerdo a especificaciones del proveedor) y se dejó 10 min en hielo y 5 min a TA. Se continuó realizando una precipitación del DNA con etanol.

Precipitación con Etanol, la reacción de digestión se llevó a un volumen final de 50 μ l (18 μ l de la reacción de digestión + 32 μ l de H₂O) + 5 μ l de NaOAC 3M, pH 7 (mezclar muy bien) + 2 Vol de EtOH absoluto (110 μ l) (mezclar). Congelar a -20 °C O/N, y centrifugar a 15 700 x g, durante 20 min, y decantar el sobrenadante, se realizan 2 lavados con EtOH 80%. Posteriormente se realizó una segunda digestión para dar dirección al inserto en el vector pSK+; después de la precipitación se resuspendió la pastilla del DNA con 16 μ l de H₂O y se adiciono 2 μ l de Buffer R 10X + 1 μ l de enzima SmaI. Se incubó 1 hora a 30 °C y posteriormente se inactivo la enzima a 80 °C.

5.2.4 Preparación del vector de clonación pSK+

Para clonar la RNAHEL se utilizó el vector de clonación pSK + (Figura 15) debido a que dicho vector cuenta con las siguientes características que permitieron una clonación exitosa. El vector contiene un extenso sitio múltiple de clonación con 21 sitios únicos de reconocimiento de enzimas de restricción que permitió seleccionar las enzimas adecuadas para una clonación dirigida, un origen de replicación que le permite replicarse independientemente dentro de la célula, resistencia a ampicilina que sirvió como un agente de selección, el sitio SmaI es un sitio de restricción dentro del promotor LacZ en el cual se pueden diferenciar las células transformantes de las transformadas recombinantes mediante la coloración.

5.2.4.1 Selección de plásmidos recombinantes por alfa-complementación, utilizando IPTG y X-gal

El IPTG (Isopropil-beta-D-tiogalactosido) es un análogo de la lactosa que no puede ser utilizado como fuente de carbono o energía por las bacterias. Cuando es agregado al cultivo de una bacteria que posee el operón lac, actúa inactivando al represor lacZ y por lo tanto induce la transcripción del operón lac. *E. coli* sintetiza una beta-galactosidasa que es capaz de hidrolizar el disacárido lactosa en los monosacáridos glucosa y galactosa. La actividad de esta enzima puede ser puesta en evidencia utilizando un sustrato cromogénico como el X-gal (5-bromo 4-cloro 3-indolil beta D galactósido) el cual es convertido por la beta-galactosidasa en un compuesto azul insoluble. Permitiendo la selección de colonias blancas de las azules.

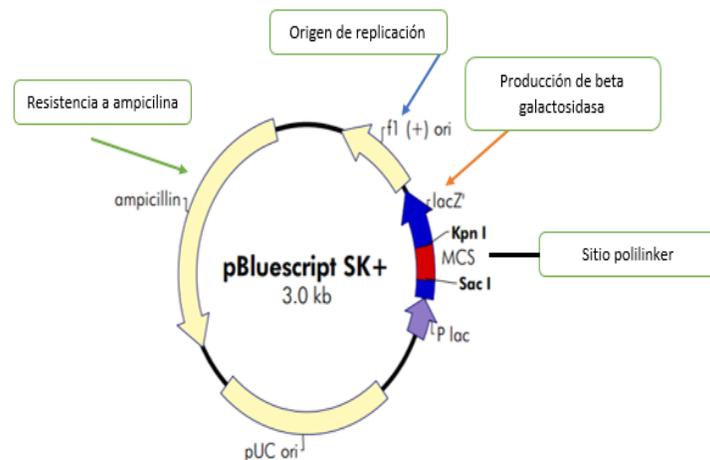


Figura 15 Vector de clonación pSK+. Flecha verde: resistencia a ampicilina en 100 µg/ml, flecha azul: origen de replicación, flecha naranja: gen lacZ que produce beta-galactosidasa, línea negra: sitio polilinker. Tamaño del vector 3.0 kb.

5.2.4.2 Protocolo de digestiones para preparación del vector

La primera digestión se realizó con la enzima EcoRI, por lo tanto se realizó una reacción de digestión en un volumen final de 20 µl y después de realizó una digestión con la enzima SmaI.

5.2.5.1 Protocolo de ligación vector e inserto RNA-HEL

Se realizó una reacción de ligación en un volumen de 20 µl con una proporción 1:1; 7 µl de H₂O + 2 µl de buffer T4 DNA ligasa (10X) + 8 µl de inserto (100 ng) + 1 µl de vector (100 ng) + 2 µl de ligasa (5 U/µl), se mezcló con la punta varias veces, y se incubó a 22 °C O/N. Se transformó con 2 µl de la mezcla de ligación (20 ng de DNA).

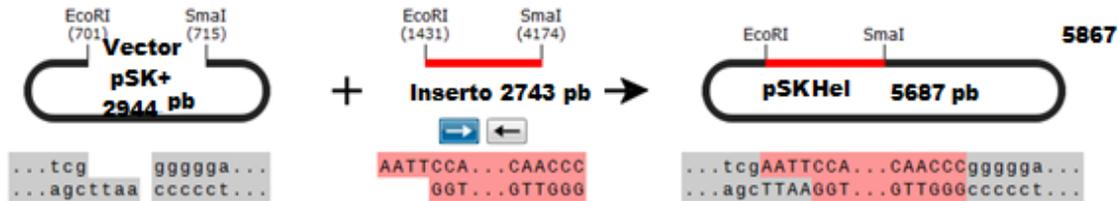


Figura 16 Ligación de vector e inserto, se muestran los sitios para las enzimas EcoRI/SmaI en el vector y el inserto y además como este queda ligado, dando como resultado la subclona pSKHel que tiene un tamaño de 5 687 pb (Imagen creada con SnapGene Viewer).

Después de la ligación del inserto-vector se transformó en la cepa Epi300TM de *E. coli* (Epicentre; Figura 16), se seleccionaron las colonias blancas de las azules y posteriormente se purificaron los plásmidos y se confirmó la clona correcta mediante digestión y electroforesis en geles de agarosa, se espera un plásmido con un tamaño de 5 687 pb mismo que denominaremos pSK-HEL (3 Kb de vector + 2.7 Kb inserto).

5.2.5.2 Preparación de células competentes por método CaCl₂ (Sambrook et al., 1989)

Día uno; se sembró la cepa de *E. coli* EP300TM y la cepa M15TM de *E. coli* en medios LB-agar (para EPI300TM sin antibióticos, y para M15TM con Km 25 µg/ml), estriar por agotamiento. Enseguida se incubó a 37 °C 24 horas (sembrar a las 8 AM para empezar a trabajar a la misma hora del día siguiente).
 Día dos; al día siguiente se realizó un pre-inóculo: se tomó una colonia grande (3 mm diámetro) y se sembró en 5 ml de medio Ψ b (ver anexo 15) en un matraz de Erlenmeyer de 125 ml. Se crece el pre-inóculo a 37 °C, en agitación (250 rpm). Se creció un tiempo aproximado de 2 horas, y se tomó lectura en el espectro hasta tener una DO₅₅₀=0.3. Se realizaron 2 cultivos 1:20 (2.5 ml del pre-inóculo en 50 ml de medio Ψ b, se usaron matraces Erlenmeyer de 500 ml (se utilizó el medio previamente precalentado a 37 °C antes de sembrar), y se incubó a 37 °C en agitación a 250 rpm, y se creció hasta obtener una

DO550=0.48 (Aprox. 2-3 h; la DO se revisó a partir de las 2 h de crecimiento), una vez obtenida la DO requerida se colocaron los cultivos en hielo; esto para detener el crecimiento. Se colocaron los cultivos de bacterias en tubos de rosca para centrifuga y se colocaron 5 min en hielo, y se centrifugaron a 4 629 x g, 5 min a 4 °C. Se tomó la pastilla y se adicionó 40 ml de buffer Tfb1 (ver anexo 16) frio. Se mezcló gentilmente para no maltratar ni romper las células. Se centrifugo a 4 629 x g, 5 min a 4 °C, y la pastilla se resuspendió en 4 ml de Tfb2 (ver anexo 17) frio y se mezcló suavemente. Se incubó 15 min en hielo. Y se repartió en alícuotas de 300 µl en tubos eppendorf (13 tubos pre-enfriados en hielo, abiertos en campana). Las células se congelaron en hielo seco-etanol y conservado a -70 ° C.

5.2.5.3 Método de transformación de células competentes (Sambrook et al., 1989)

En tubos eppendorf se colocó la mezcla de ligación (de 20 ng a 100 ng de DNA; sin exceder el vol. de 5 µl) y se dejó en hielo 5 min. Se tomó un tubo del ultracongelador a -70 °C (un tubo con 300 µl de células competentes), se utilizaron 50 µl de células competentes para cada transformación mismas que se descongelaron en hielo. Al tubo con los 300 µl de células competentes, se le adicionaron 30 µl de β-mercaptoetanol 250 mM (1.8 β-mercaptoetanol en 100 µl de H₂O, preparado en fresco), se incubó 10 min en hielo y adicionó a cada tubo eppendorf con el DNA, 50 µl de células competentes, y mezcló con la misma punta suavemente 2 veces. Se incubó 30 min en hielo (preparar termo-block a 42 °C). Shock térmico a 42 °C, 90 segundos, y 2 min en hielo. Se adicionaron 200 µl de medio Ψ b e incubó 1 h, 37 °C en agitación a 250 rpm. La siembra se hizo con la ayuda de un asa grande en forma de triángulo 50 µl de la transformación, en caja Petri con antibióticos apropiados. Para el caso de la cepa EPI300TM: LB agar + Amp 100 µg/ml suplementado con IPTG y X-gal. Para el caso de la cepa M15: LB agar + Amp 100 µg/ml + Km 25 µg/ml.

5.2.6 Selección de células transformadas

La Selección de células transformadas tiene como base el sistema de lacZ, en el cual se pueden diferenciar las células transformadas de las transformadas recombinantes por la coloración; ya que las colonias transformadas recombinantes presentan una coloración blanca que nos indica que el fragmento de interés se pudo ligar interrumpiendo el marco de lectura

del gen LacZ, lo que impide que pueda hidrolizar X-gal, un análogo de la lactosa; que al ser hidrolizado produce una coloración azul y si la secuencia que codifica el péptido alfa no está completa, la complementación no se hace y las colonias quedan blancas. El análisis de las células seleccionadas mediante la comparación de los perfiles de restricción generados con la enzima EcoRI para linearizar el plásmido recombinante y posteriormente con SmaI para separar el vector del inserto. Se enfatiza en que dichas enzimas se utilizaron para poder realizar la clonación sitio dirigida, por lo tanto ambos sitios quedarán intactos.

5.3 Caracterización de las proteínas

Uno de los aspectos más importantes para este proyecto es la caracterización de ambas proteínas de interés mediante bioensayos de inyección en larvas de *Phyllophaga*.

5.3.1 Colecta y selección de larvas

Se colectaron las larvas de *Phyllophaga* directamente de campo, la colecta se realizó en la comunidad de Buena Vista del Monte, las larvas colectadas fueron trasladadas al laboratorio en cajas Petri con tierra del terreno de donde fueron colectadas, mismas que fueron alimentadas diariamente con trozos de zanahorias hasta su uso, cabe destacar que durante el periodo de alimentación e identificación de larvas, se seleccionan todas aquellas larvas sanas, las cuales no presenten síntomas de enfermedad, ni se observen maltratadas, esto nos ayudó a corroborar que al realizar los bioensayos, la respuesta obtenida sea directamente de las proteínas y no por un factor externo.

5.3.2 Identificación de larvas

Se realizó una identificación de las larvas de acuerdo al patrón del raster (Figura 17; lado izquierdo), y serán comparadas a las claves morfológicas (Ramírez-Salinas et al., 2000, 2004), posteriormente fueron colocadas en recipientes de plástico, se seleccionaron grupos homogéneos de larvas con una $n < 10$ (esto dependió de la disponibilidad de larvas).

5.3.3 Bioensayos de inyección en larvas

Es importante mencionar que se utilizaron controles positivos y negativos para cada experimento de igual manera el monitoreo de los tratamientos se llevó a cabo mediante el registro de los siguientes datos, los cuales fueron tomados diariamente y siempre en el mismo horario.

Tabla 3 Registro de datos

No. Larva	% Alimentación	Coloración	Movimiento	Flacidez	Mortalidad	Enferma	Observaciones
-----------	----------------	------------	------------	----------	------------	---------	---------------



Figura 17 Identificación de larvas, de lado izquierdo una imagen demostrativa del ráster de las larvas, de lado derecho la selección de larvas sanas y alimentación para los bioensayos.

5.4 Sobrenadantes de cultivos bacterianos

Para los bioensayos con insectos, se utilizaron cultivos bacterianos previamente crecidos en el medio Luria Bertani (con antibióticos correspondientes) en agitación a 250 rpm, a 37°C durante 72 horas. Los cultivos se centrifugaron a 5,000 x g 10 minutos, los sobrenadantes se esterilizaron por filtración mediante membranas millipore de 0.22µm. Los sobrenadantes concentrados fueron obtenidos por ultrafiltración con un sistema de membranas con exclusión molecular de 3 kDa (Centricon-plus-20; Millipore Corp., Bedford, MA).

5.4.1 Cuantificación de la proteína

La cantidad de proteína que se obtuvo en los sobrenadantes de cultivos concentrados se determinó por el método colorimétrico de Bradford, que consiste en la unión del colorante

azul de Coomassie a las proteínas y su cuantificación mediante un espectrofotómetro realizando lecturas a una DO de 595 nm. Se prepararon las muestras con diluciones de BSA de 2, 5, 10, 20 ($\mu\text{g/ml}$) para realizar una curva estándar y en el caso de las proteínas en los sobrenadantes de cultivo se usaron 5 μl de la muestra para tomar lectura de cada una. En todos los casos, se aforó con agua destilada hasta un volumen de 800 μl . Las lecturas de las muestras se realizaron a 595 nm y los valores obtenidos se graficaron para obtener la ecuación de la recta donde los valores de Y son la absorbancia promedio de cada muestra y el valor de X despejado es la concentración de proteína ($\mu\text{g}/50\mu\text{l}$).

5.5 Expresión del gen RNA-HEL en el sistema de vectores de expresión pQE

5.5.1 Obtención del inserto de RNA-HEL mediante enzimas de restricción

En este trabajo hemos seleccionado el sistema de vectores de expresión pQE (QIAGEN; Figura 18) el cual ha sido diseñado para tener una expresión de proteínas de alto nivel portadoras de seis residuos de histidina (6xHis) en *E. coli*; se basa en el sistema de transcripción-traducción con el promotor T5. Estos plásmidos producen un bajo número de copias y presentan las siguientes características:

1. Elemento promotor-operador optimizado, que consiste en el promotor del fago T5 (reconocido por la RNA polimerasa de *E. coli* y dos secuencias del operador lac que aumentan la unión al represor lac y asegura la represión eficaz del promotor T5. El cual al ser reprimido significa que contiene altos niveles de expresión de proteínas.
2. Sitio de unión al ribosoma, RBSII para altas velocidades de traducción.
3. Etiqueta de 6xHis, secuencia de codificación 5' o 3' de la región de clonación y que facilita la purificación por afinidad a Níquel mediante el uso de la resina acoplada a Níquel-acido-nitrilo-tri-acético (Ni-NTA) (QIAGEN).
4. Sitio múltiple de clonación y de alto de la traducción de codones en todos los marcos de lectura, para la preparación conveniente de construcciones de expresión.
5. Dos fuertes terminadores de la transcripción: t0 del fago λ y T1 del operon *rrnB* de *E. coli*, para evitar la lectura a través de la transcripción y garantizar la estabilidad del gen de la construcción de expresión.
6. β -lactamasa (*bla*) que confiere resistencia a la ampicilina en 100 $\mu\text{g} / \text{ml}$.

Debido a que se transformó en la cepa M15 de *E. coli* (QIAexpress, QIAGEN), esta cepa contiene el plásmido pREP-4 que produce un bajo número de copias, el cual confiere resistencia a Kanamicina y codifica para el gen *lacI* que expresa el represor *Lac*. Debido a que el promotor T5 es un promotor relativamente fuerte produce un alto número de copias de proteínas marcadas con 6xHis, el plásmido pREP4 participa como un regulador en la transcripción de la proteína recombinante, de esta manera para trabajar el sistema de vectores pQE (QIAexpress, QIAGEN) para la clonación, la presencia del vector pREP-4 mantiene reprimida la transcripción, y posteriormente para expresar la proteína se induce con adición de Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) ya que se une rápidamente con la proteína represora *Lac* y la inactiva. Cuando es reprimido el gen *LacI*, la ARN polimerasa de la célula puede transcribir la proteína recombinante.

5.5.1.1 Preparación del inserto a partir de pSK-HEL

Como un segundo paso de la clonación; primero se realizó una digestión en el plásmido pSK-HEL con la enzima HindIII que se encuentra en el extremo 5' al final del sentido de la transcripción del gen, como segunda digestión se utilizó la enzima HincII que corta en el extremo 3' produciendo extremos romos, dicha enzima corta en la región del N-terminal de la proteína, deletando a la Metionina y además 2 nucleótidos más del aminoácido Leucina, quedando trunco en 2 nucleótidos (Figura 19).

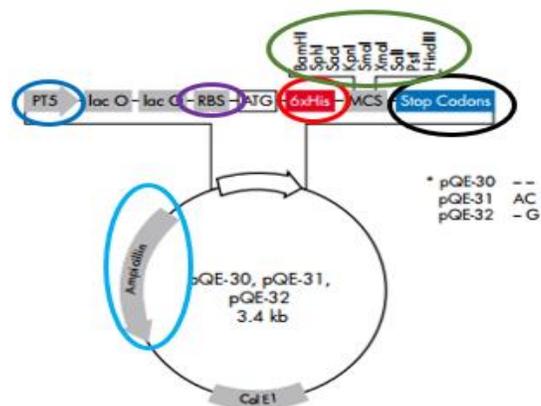


Figura 18 Vector de expresión pQE-31. En Azul marino: Elemento promotor-operador. Morado: Sitio sintético de unión al ribosoma RBSII. Rojo: Etiqueta de 6xHis. Verde: Sitio de clonación múltiple y de parada. Negro: Dos fuertes terminadores de la transcripción. Azul cielo: β-lactamasa (bla).

5.5.1.2 Protocolo de digestiones para preparación del inserto

La primera digestión se realizó con la enzima HindIII, por lo tanto, se realizó una reacción de digestión en un volumen final de 20 μ l. Segunda digestión: después de precipitar el DNA la pastilla se resuspendió en 16 μ l de H₂O + 2 μ l de buffer B + 1 μ l de enzima HincII (5 U/ μ l), se incubó 1 hora a 37 °C. Debido a que HincII produce extremos romos fue posible la ligación con el vector digerido con SmaI que también produce extremos romos.

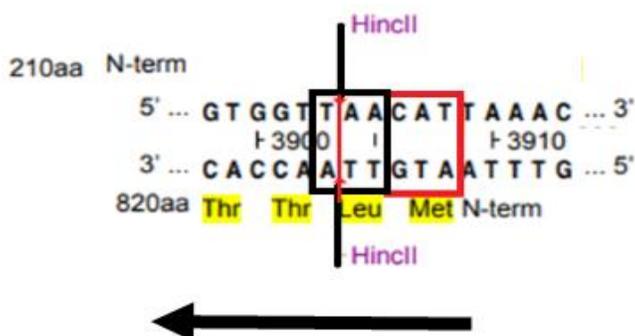


Figura 19 Sitio de corte de HincII, se señala el corte romo en el inserto en donde se deletea la Metionina del gen, y que además deja el aminoácido Leucina trunco en dos nucleótidos, quedando roto el marco de lectura.

5.5.1.3 Preparación del vector de expresión pQE-31

Debido a que el inserto quedó desfasado, el triplete de leucina queda trunco en 2 nucleótidos, como característica principal del vector pQE-31, es que tiene 2 nucleótidos extra, con los cuales se complementó el triplete que anteriormente quedo trunco, de esta manera tendremos la construcción con un marco de lectura abierto y correcto. Se utilizaron dos enzimas la primera HindIII en el extremo 3' que genera extremos cohesivos, y la segunda digestión SmaI que corta en el extremo 5' que genera extremos romos (Figura 20).

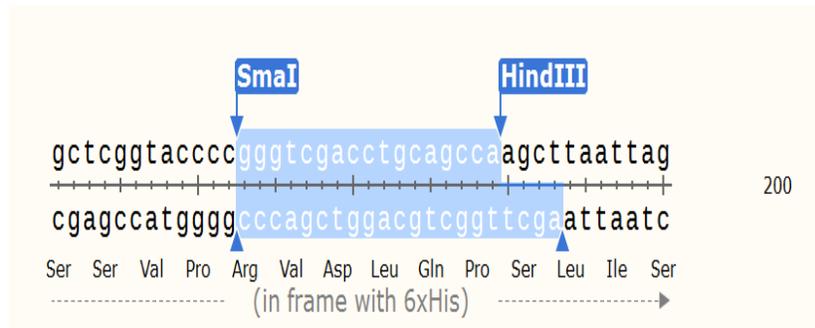


Figura 20 Preparación del vector. Se muestran los dos sitios de corte SmaI/HindIII y como quedan los extremos para una clonación dirigida.

5.5.1.4 Protocolo de digestiones para preparación del vector pQE-31

Como primera digestión con la enzima HindIII, se realizó una reacción de digestión en un volumen final de 20 µl. Segunda digestión: después de precipitar el DNA la pastilla se resuspendió en 16 µl de H₂O + 2 µl de buffer R+ 1 µl de enzima HincII (5 U/µl), incubar 1 hora a 30 °C.

5.5.2 Ligación del vector e inserto

Después de ambas digestiones en el vector y el inserto se corrió un gel de agarosa al 1% con ambos; se cortó la banda de DNA del vector a partir del gel esto nos ayudó para evitar la posibilidad de tener falsos positivos, ya que en este sistema no existe la manera de seleccionar colonias por coloración. Se cortaron las bandas y se purificó el DNA del gel con el Kit E.Z.A Gel extraction kit de OMEGA bio-tek. En la Figura 21 se muestra de las digestiones realizadas tanto en el vector como en el inserto, de igual manera se muestra el resultado final esperado de la ligación del inserto y vector, generando la clona p31-HEL que tiene un tamaño de 5 926 pb. Se ligó el vector e inserto, para posteriormente transformar en la cepa M15 de *E. coli*, se picaron colonias y se realizó la extracción de plásmido (Miniprep) mediante lisis alcalina (Sambrook et al., 1989). Finalmente, se realizaron digestiones a los candidatos para corroborar su tamaño molecular y así poder tomarlos como candidatos positivos.

Protocolo de ligación del vector p31-HEL y el inserto RNA-HEL

Se realizó una reacción de ligación en un volumen de 20 µl con una proporción 1:2; 7 µl de H₂O + 2 µl de buffer T4 DNA ligasa (10X) + 8 µl de inserto (200 ng) + 1 µl de vector (100 ng) + 2 µl de ligasa (5 U/µl), se mezcló con la punta varias veces, y se incubó a 22 °C O/N. Se transformó con 2 µl de la mezcla de ligación (20 ng de DNA) en la cepa M15 de *E. coli*.

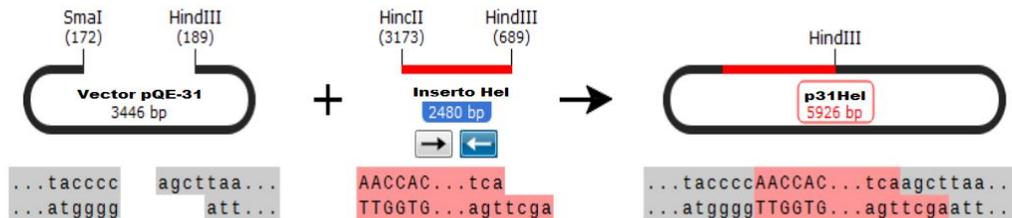


Figura 21 Ligación de vector e inserto, se muestran los sitios para las enzimas SmaI/HindIII en el vector y los sitios para HincII/HindIII en el inserto, de igual manera se muestra el resultado final de la ligación entre ambos, obteniendo así la subclona p31HEL con un tamaño de 5 926 pb (Imagen creada con el software SnapGene Viewer).

5.6 Sistema de expresión pET-22b(+)

Los experimentos de expresión de proteína mostraron nula producción de la misma. (QIAGEN), se decidió buscar un nuevo sistema de expresión, debido a que en el Laboratorio de Patogenicidad es indispensable estandarizar un sistema de expresión de proteínas para así poder usarlo en experimentos posteriores. Nos vimos en la necesidad de hacer una búsqueda para detectar el sistema de expresión que contenga las características adecuadas para una expresión de proteínas recombinantes que nos facilite la obtención del mismo bajo condiciones nativas y tener la proteína plegada adecuadamente y al mismo tiempo nos etiquete la proteína para que la purificación sea sencilla.

De acuerdo a especificaciones del proveedor, sugiere que es un sistema de los más eficientes para la expresión de proteínas recombinantes, el cual cuenta con la característica fundamental el promotor T7 el cual es un promotor más fuerte que el promotor T5 que contiene el anterior sistema pQE con el que se obtuvieron resultados negativos; dichas características se observan en la figura 22, cuenta con la presencia de un lac Operador el cual a comparación de los vectores pQE poseen 2 lac Operadores; posee un codón de inicio al igual que el sistema pQE, por lo que es importante eliminar el ATG de la proteína; otra de las características fundamentales por lo que este sistema es más novedoso en comparación al sistema pQE, es

la presencia de un péptido señal pelB el cual envía a la proteína recombinante hacia el espacio periplásmico en donde podremos sacar la proteína de una manera más sencilla y además el periplasma ofrece la ventaja de encuentra menor cantidad de proteínas contaminantes; tiene un sitio múltiple de clonación al igual que el sistema pQE; posee una etiqueta de 6xHis en el extremo C-terminal, que a diferencia del sistema pQE se puede encontraren el N-terminal. Es importante que previo a la expresión de la proteína secuenciar completamente las construcciones, ya que la proteína debe fusionarse al péptido señal en el extremo 3' y en el extremo 5' con la etiqueta de 6xHis.

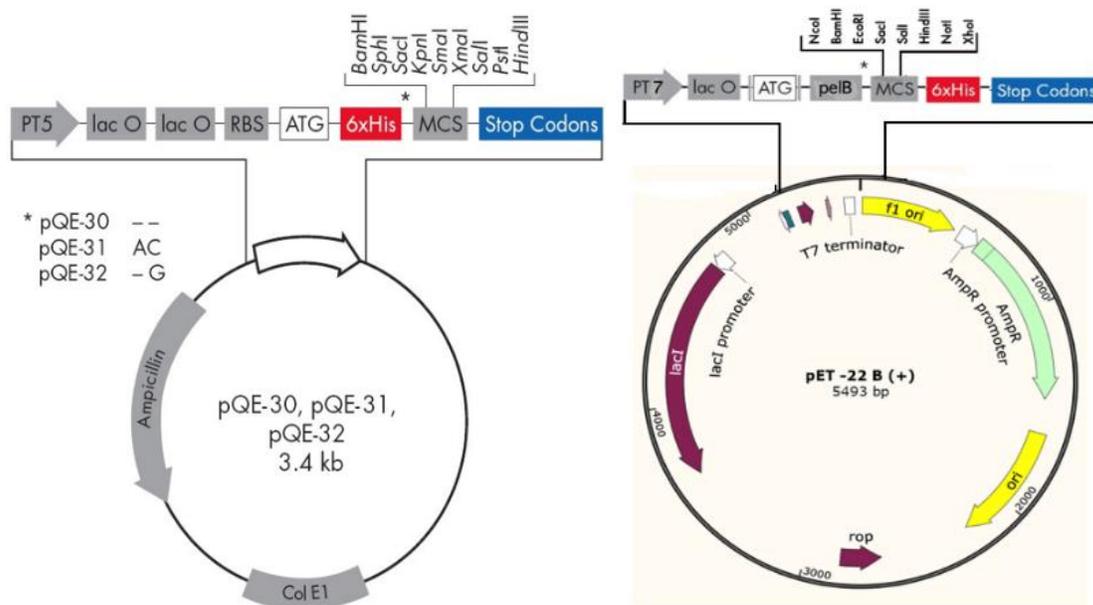


Figura 22 Comparación de los sistemas de expresión. De lado izquierdo se encuentra el sistema de vectores de pQE (QIAGEN); de lado izquierdo el nuevo sistema de vectores pET-22 B (Novagen).

5.6.1 PCR para clonar en el vector pET-22b(+)

Se diseñaron los oligonucleótidos para ambos genes (GT-PBP y RNA-HEL), los oligos fueron diseñados con la finalidad de eliminar en ambos genes el codón de inicio y así fusionar el péptido señal (pelB) del vector pET-22b en el N-terminal y de igual manera eliminar el codón de paro en el C-terminal de la proteína, de tal manera se garantiza tanto la fusión de la proteína con la etiqueta de 6xHis como el empleo del codón de paro propio del vector. Se utilizó la construcción original C8-F3 (Figura 23), que contiene ambos genes intactos, cabe

señalar que se agregaron sitios de restricción sintéticos (NcoI y NotI) en cada oligo para así poder realizar una PCR obteniendo así los productos que se utilizaran en la clonación de los genes.

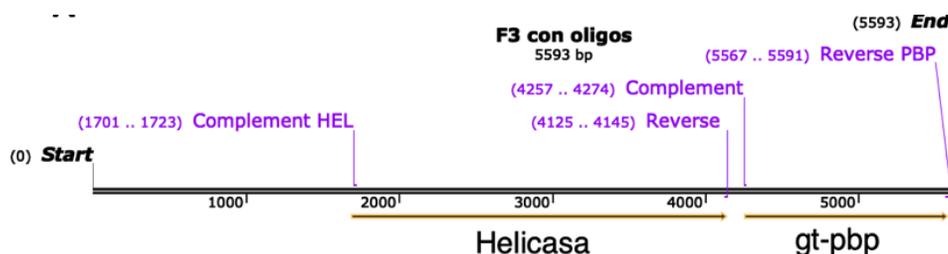


Figura 23 oligonucleótidos en F3; clona C8-F3 con los oligos que se crearon dentro de F3.

Tabla 4 Diseño de oligonucleótidos

Clave de oligo	Secuencia (Subrayado el sitio de restricción)	Longitud	Sitio añadido
Dir-Hel-NcoI	TCGGCCATGGCAGCGGTA ^T CTTGATGAGTTGCT C	33 pb	NcoI
Rev-Hel-NotI	TCAGCGGCCGCCTGGTACTTTTTGGTCCGGCG	32 pb	NotI
Dir-PBP-Gly-NcoI	TCAGCCATGGCAGCCGGGATGACCGCGAG	30 pb	NcoI
Rev-PBP-Gly-NotI	TCAGCGGCCGCATCCAGAGTGGTGAAA ATT TTC ACG	36 pb	NotI

Se realizó un protocolo para genes con alto contenido en GC debido a que el protocolo convencional no dio un resultado positivo. Se adicionó el compuesto orgánico DMSO (Dimetilsulfóxido), el cual es usado en la PCR y otras reacciones en la biología molecular para interrumpir la formación de estructuras secundarias en el DNA, lo cual ocurre en genes que poseen un alto contenido en GC.

Tabla 5 Reacción de PCR para amplificación de RNA-HEL y GT-PBP

Componentes	Volumen
H ₂ O (libre de nucleasas)	23.5 µl
10X long PCR buffer	5 µl
MgCl ₂ 25 mM	5 µl
dNTP's	3 µl
Oligo directo 10 pmolas/µl	5 µl
Oligo reverso 10 pmolas/µl	5 µl
DNA 20 ng	1 µl

DMSO 4%	2 μ l
High Fidelity PCR enzyme mix (2.5U/ μ l)	0.5 μ l
Volumen total	50 μ l

5.6.2 Construcción de pTZ-HEL

Después de haber realizado la reacción de PCR, se procedió a realizar las digestiones enzimáticas con NcoI/NotI para preparar vector e inserto y ligarlos entre sí con el fin de obtener la construcción pET22-HEL. Sin embargo, no se obtuvieron resultados positivos, por lo que procedimos a realizar una estrategia de dos pasos. El primer paso consiste en realizar una construcción con el vector de clonación pTZ57R /T el cual se encuentra listo para usarse en una ligación eficiente con productos de PCR que proporcionan altos rendimientos de clonación. Para aumentar la velocidad y la eficiencia de la clonación, el kit de clonación de PCR InsTAclone se ha combinado con la presencia del gen lacZ, que ayuda a la selección de transformantes positivos por la coloración de colonias blancas y azules. Esta estrategia nos ayudó a la obtención de digestiones eficientes y controladas con las enzimas NcoI/NotI, de tal manera que se logre continuar con el siguiente paso en la clonación en el vector de expresión pET-22b.

Reacción de ligación del vector pTZ57R /T y el producto de PCR

Se realizó una reacción de ligación en un volumen de 20 μ l con una proporción 1:1; 7 μ l de H₂O + 2 μ l de buffer T4 DNA ligasa (10X) + 8 μ l de inserto (100 ng) + 1 μ l de vector (100 ng) + 2 μ l de ligasa (5 U/ μ l), se mezcló con la punta varias veces, y se incubó a 22 °C O/N. Se transformó con 2 μ l de la mezcla de ligación (20 ng de DNA).

Se transformó en la cepa Epi300 de *E. coli*.

5.6.3 Construcción de pTZ/SK-HEL

Se procedió, a realizar una construcción que permitiera obtener un inserto intacto y además sin codón de inicio ni codón de paro, previo a la clonación en el vector de expresión pET. Se partió de dos construcciones previamente obtenidas (figura 24).

Primeramente, para generar el inserto, se siguió la estrategia ilustrada en el panel A) se utilizó como vector la construcción pTZ-HEL digerido con las enzimas XhoI/SacI, eliminando así

la mitad del gen de HEL correspondiente a la región N-terminal de la HEL con secuencia “alterada”; de esta manera se conserva el sitio sintético NotI generado por la PCR el cual se encuentra en la región C-terminal de la HEL. Para la obtención del inserto intacto, portador de la región N-terminal de la HEL (eliminado en el paso previo), se utilizó la construcción pSK-HEL (obtenida y secuenciada previamente en el objetivo 1), dicha construcción conserva el gen completo e intacto. Se realizó la digestión con las enzimas XhoI y SacI; para este caso, el codón de inicio puede ser eliminado posteriormente con una digestión con la enzima HincII.

Reacción de ligación de vector y el inserto

Se realizó una reacción de ligación en un volumen de 20 µl con una proporción 1:4; 7 µl de H₂O + 2 µl de buffer T4 DNA ligasa (10X) + 8 µl de inserto (200 ng) + 1 µl de vector (50 ng) + 2 µl de ligasa (5 U/µl), se mezcló con la punta varias veces, y se incubó a 22 °C O/N. Se transformó con 2 µl de la mezcla de ligación (20 ng de DNA). Se transformó en la cepa Epi300 de *E. coli*.

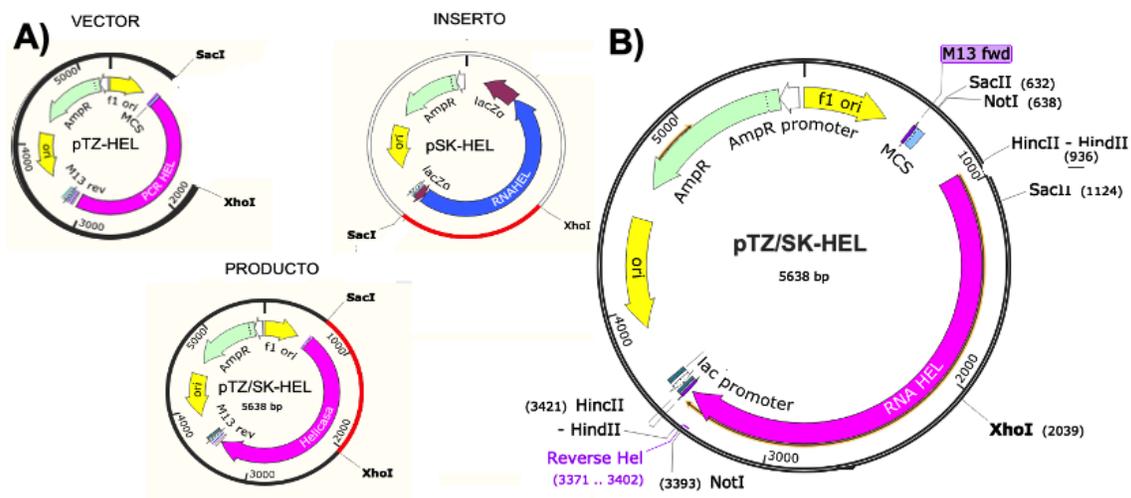


Figura 24 Construcción pTZ/SK-HEL, panel A) estrategia de clonación donde se utilizó como vector, la construcción pTZ-HEL y como origen del inserto (región N-terminal intacta), la construcción pSK-HEL, panel B) se muestra la construcción obtenida con un tamaño de 5 638 pb.

5.6.4 Construcción de la RNA-HEL en pET-22b(+)

Se realizó una digestión en el vector pET-22(+), con las enzimas NotI en el extremo 3' del vector que genera un corte cohesivo, posteriormente se digirió con la enzima Eco53kI la cual

realiza un corte en el extremo 5', generando así un extremo romo; para obtener el inserto se utilizó la construcción pTZ/SK-HEL digerida con las enzimas NotI en el extremo 3' del gen del cual se eliminó el codón de termino, como segunda digestión se utilizó la enzima HincII la cual genera extremos romos. Ambas digestiones se complementan entre sí para fusionar la proteína en el N-terminal con el péptido señal del vector y en el C-terminal con los 6xHis del mismo. De esta manera se obtiene un marco de lectura abierto.

5.6.4.1 Protocolo de ligación del vector pET-22b(+) e inserto RNA-HEL

Es importante mencionar que se siguió un protocolo diferente de ligación al convencional, sugerido por la casa comercial (Novagen)

La reacción de ligación se realizó en un volumen final de 10 µl con una proporción 1:1; se adicionó 1 µl de H₂O (libre de nucleasas) + 1 µl + 4 µl DNA vector e inserto (200 ng) + 1 µl PEG 4 000 10% + 1 µl DTT 10 mM + 1 µl ATP 10 mM + 1 µl buffer ligasa 10x + 1 µl ligasa (5U/µl); se mezcló gentilmente y se incubó a 22 °C O/N. Y se transformó en la cepa de expresión BL21 de *E. coli*.

5.6.5 Construcción de pET22-GT-PBP

Debido a los múltiples resultados negativos en la obtención del producto de PCR se realizó una estrategia por medio de digestiones enzimáticas en las construcciones ya obtenidas de GT-PBP, de tal manera que finalmente se obtuviera una clonación en el vector de expresión pET-22b.

5.6.5.1 Preparación del vector pET-22b(+)

Se digirió primero el vector con la enzima EcoRI que corta en el extremo 5' del vector, dicha enzima genera extremos cohesivos; se realizó una segunda digestión con la enzima HindIII la cual realiza un corte en el extremo 3' del vector, misma que generó extremos cohesivos.

5.6.5.2 Preparación del inserto a partir de pQE-GT-PBP

Se digirió la clona pQE-GT-PBP portadora del dominio GT-PBP con la enzima EcoRI la cual genera extremos cohesivos en el extremo 5' del gen; se realizó una segunda digestión con la

enzima HindIII la cual corta en el extremo 3' generando así extremos romos. El gen quedó flanqueado por las enzimas EcoRI/HindIII con un tamaño de 1.3 Kb, dichos extremos cohesivos son compatibles con los extremos generados con las enzimas EcoRI/HindIII del vector. Cabe destacar que como parte importante y fundamental de la construcción en el vector de expresión pET-22b(+) es fusionar el péptido señal del N- terminal así como también fusionar en el C- terminal, la etiqueta de 6xHis al dominio GT-PBP. Por lo que el siguiente paso antes de la expresión es enviar a secuenciar.

5.6.5.3 Ligación del vector pET-22b(+) y el inserto portador de GT-PBP

Se siguió un protocolo diferente de ligación al convencional, sugerido por la casa comercial (Novagen).

La reacción de ligación se realizó en un volumen final de 10 µl con una proporción 1:1; se adicionó 1 µl de H₂O (libre de nucleasas) + 1 µl + 4 µl DNA vector e inserto (200 ng) + 1 µl PEG 4 000 10% + 1 µl DTT 10 mM + 1 µl ATP 10 mM + 1 µl buffer ligasa 10x + 1 µl ligasa (5U/µl); se mezcló gentilmente y se incubó a 22 °C O/N. Finalmente se transformó en la cepa de expresión BL21 de *E. coli*.

5.7 Purificación de las proteínas recombinantes

Es importante mencionar, que como primer paso se realizó una purificación en cultivos pequeños (5-15 ml), debido a la necesidad de economizar y estandarizar las técnicas para cada proteína a expresar, a continuación se presenta la metodología que se siguió en la purificación de los dos sistemas de expresión que se utilizaron en este proyecto. Se procedió a purificar las proteínas RNA helicasa y el dominio GT-PBP según especificaciones del Proveedor (QIAGEN y Novagen).

5.7.1 Expresión y purificación de las proteínas con afinidad a colas de histidina

La expresión óptima de proteínas recombinantes en diversos sistemas de expresión que incluyen *E. coli*, se logra de manera sencilla cuando los vectores y las células huésped son cuidadosamente seleccionados, así como también cuando las condiciones de crecimiento son controladas. Las condiciones de cultivo, así como la inducción de la expresión, tienen efectos en la forma en que se produce la proteína recombinante, por lo que es importante establecer

empíricamente las condiciones óptimas con cultivos a pequeña escala antes de la purificación a una escala mayor. Dichas proteínas pueden producirse de forma soluble, pero en la mayoría de los casos se forman cuerpos de inclusión insolubles. La formación de los cuerpos de inclusión está influenciada por la naturaleza de la proteína, por la célula huésped y por el nivel de expresión que resulta de la elección del vector y la inducción. La mayoría de las proteínas con cuerpos de inclusión se solubilizan simplemente con detergentes o agentes desnaturizantes tales como Urea 8 M o GuHCl 6 M, antes de iniciar el proceso de purificación. En la Figura 25 se explica el proceso de la purificación con el sistema de vectores de expresión pQE bajo condiciones nativas y desnaturizantes (QIAGEN).

5.7.1.1 Inducción de las proteínas recombinantes (sistema de vectores de expresión pET-22b(+) y pQE)

Día 1. Primeramente, sembrar en caja de LB suplementado con los antibióticos requeridos para cada construcción, además como control negativo se utilizó el vector vacío transformado en la cepa de expresión de cada vector.

Día 2. Siembra en tubo: se picó una colonia y se sembró en 5 ml de LB suplementado con los antibióticos requeridos para cada tratamiento; se incubó a 37 °C a 250 rpm O/N.

Día 3. Se precalentó primeramente el medio (con la finalidad de no provocar cambios en las condiciones presentes en el preinoculó en crecimiento), se continuó sembrando 50 ml de medio con antibióticos + 500 µl del preinoculó. Se creció a 37 °C a 250 rpm, hasta tener una DO₆₀₀ de 1.0. Se procedió a tomar 2 fracciones de 5 ml del medio crecido con la DO₆₀₀=1.0 en un tubo falcón de 50 ml, a la primer fracción no se le fue adicionado IPTG, la cual se etiqueto como tratamiento sin inducir, la segunda fracción se le fue adicionado IPTG en una concentración final de 5 mM y se etiqueto como tratamiento inducido.

La inducción se llevó a cabo en diferentes tiempos, primero se monitoreo durante las primeras 6 horas de la inducción y posteriormente durante 12 h. Se incubó a diferentes temperaturas para poder determinar las condiciones adecuadas para cada proteína, a 250 rpm.

5.7.1.2 Cosecha de células

Se centrifugaron los tratamientos a 2 ml, 1 min a 15 000 x g a 4 °C. Eliminamos el sobrenadante y fueron congelados los botones celulares a -20 °C hasta su uso (en este paso puede durar varios meses) para analizar el curso de la expresión por SDS-PAGE.

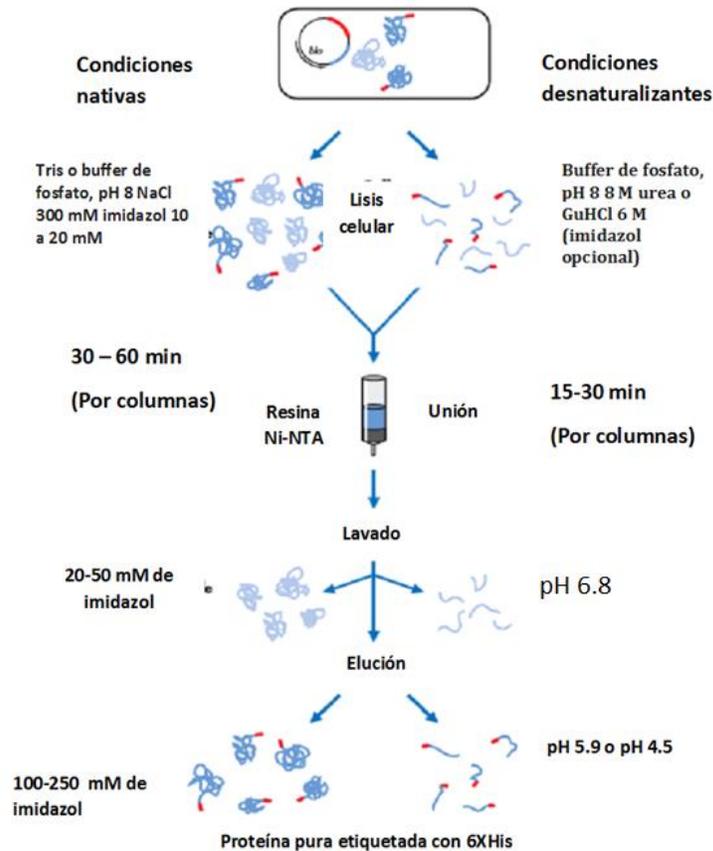


Figura 25 Purificación de proteínas recombinantes con 6xHis. Se muestra el procedimiento a realizar para la purificación de las proteínas, en condiciones nativas (lado izquierdo) y condiciones desnaturalizantes (lado derecho). (Tomado y modificado de The QIAexpressionist™).

5.7.2 Extracción de proteínas bajo el sistema de expresión pQE

El protocolo siguiente es básico para la detección y expresión de proteínas en pequeños cultivos. La purificación se realizó primeramente bajo condiciones desnaturalizantes para aislar cualquier proteína independientemente de la solubilidad dentro de la célula. El lisado celular se realizó con el buffer B (ver anexo 18), el cual permite la solubilización de proteínas y cuerpos de inclusión facilitando el análisis directo por SDS-PAGE. El protocolo no incluye pasos de lavado astringentes, por lo tanto, no se puede esperar un producto 100% puro, a pesar de ello este protocolo nos ayudó a la detección de manera fácil y rápida de la proteína

para posteriormente afinar detalles para la purificación y expresión de la misma; ya que además aísla otras proteínas propias de la célula que no se encuentran marcadas. Para la purificación bajo condiciones nativas se utilizó un buffer de lisis (ver anexo 19) este buffer a diferencia del buffer B (desnaturalizante) es menos agresivo, pues no contiene agentes que desnaturalicen las proteínas. Estas condiciones permiten obtener la proteína nativa, sin algún cambio con el fin de poder utilizarla en futuros bioensayos, y evitar que la proteína pierda actividad por la desnaturalización de la misma. Sin embargo, no todas las proteínas se pueden purificar bajo condiciones nativas, por lo que se requieren más pasos para su renaturalización, y en algunas ocasiones el plegado ya no es mismo. Por lo tanto, en este trabajo purificar la proteína bajo condiciones nativas es de suma importancia, debido a que esto nos garantiza saber la naturaleza de la proteína recombinante; si la proteína tiene o no actividad en su estado nativo. Cabe mencionar que la cantidad de proteína recombinante obtenida bajo condiciones nativas es menor, que bajo condiciones desnaturalizantes, debido a que el buffer de lisis nativo es menos agresivo en la ruptura de las membranas celulares, y el buffer desnaturalizante además de romper membranas, cuerpos de inclusión también desnaturaliza todas las proteínas.

5.7.2.1 Lisado celular (12.5-15 ml) bajo condiciones desnaturalizantes (sistema de vectores de expresión pQE)

Terminada la inducción de las proteínas se procede a colectar el cultivo final para centrifugarlo 10 min a 15 000 x g, y el sobrenadante se descarta. Se continúa resuspendiendo la pastilla celular en 400 µl de buffer de lisis (esto para un vol. final de 15 ml) para el caso de los tubos colectados durante el curso de la expresión se lisaron las células con 50 µl de buffer de lisis (ver anexo 18) se mezcló gentilmente con pulsos de vórtex evitando la formación de espuma, hasta lograr una mezcla clara sin grumos; esto nos asegura una lisis completa. El volumen de cultivo usado dependió del nivel de expresión pero siempre cuidando usar las mismas proporciones. El lisado celular fue centrifugado por 30 min a 15 000 x g para remover residuos celulares y el sobrenadante fue transferido a un tubo fresco.

Purificación de proteínas del periplasma pET-22b (+)

Una de las ventajas que ofrece *E. coli* como hospedador es que las proteínas expresadas pueden enviarse a tres diferentes localizaciones celulares: citoplasma, periplasma y medio extracelular (medio de cultivo), cada uno de estas localizaciones ofrece ventajas y desventajas (Gonzales y Fillat., 2018). En ocasiones resulta de mejor elección la exportación de la proteína hacia el espacio periplasmático, debido a que este ofrece un ambiente oxidante el cual favorece la formación de puentes disulfuro, disminuye la posibilidad de degradación proteolítica dado el menor número de proteasas celulares presentes y simplifica la purificación al concentrar el producto deseado en un compartimiento mucho menos rico en proteínas celulares que el citosol. La exportación de una proteína heteróloga al periplasma requiere la incorporación de una secuencia señal en el extremo N-terminal del gen clonado (Al-Hejin et al., 2019). Una gran variedad de péptidos señales procariotas han sido utilizados con éxito como lo es el vector de expresión pET-22b (+), el cual cuenta con la característica fundamental de poseer el péptido señal pelB, que envía la proteína al periplasma, facilitando también la obtención de la proteína de forma nativa por medio de un protocolo de choque osmótico (Al-Hejin et al., 2019; Gonzales y Fillat., 2018).

5.7.3.1 Extracción de proteínas del periplasma

Primeramente, se descongelaron los pellets bacterianos por 15-20 min a TA, una vez descongelados se le adiciono el 10% del volumen del cultivo, para todas las muestras (GT-PBP, HEL y vector vacío) se les adicionó 2 ml de buffer SET (Sacarosa 20%; EDTA 5 mM; TRIS 20 mM) y se agitó a 250 rpm durante 15 min, hasta que la mezcla esté clara y los pellets estén disueltos. Se centrifugó durante 10 min a 8 200 xg, a 4°C, y se colectó la muestra para posteriormente analizarla por SDS-PAGE.

Como segundo paso, el pellet celular obtenido en el paso anterior fue nuevamente resuspendido en 10% del volumen del cultivo en buffer MgSO₄ 5 mM (guardado a 4°C) y se incubó 15 min en hielo, se revisó que la mezcla estuviera clara para centrifugar a 8 200 xg durante 10 min, se colecto la muestra para posteriormente analizarla por SDS-PAGE.

5.8 Purificación de las proteínas con afinidad a la resina de Níquel

Es de gran importancia purificar una proteína bajo condiciones nativas ya que cuando la proteína es desnaturizada, las estructuras de orden superior (secundaria, terciaria y cuaternaria) se pierden, quedando la cadena polipeptídica reducida a un polímero estático, la estructura tridimensional fija y como consecuencia también se pierde su actividad biológica. Un aspecto importante de las condiciones nativas es el uso del imidazol. Debido a que dicha sustancia es un análogo de la histidina, es usado para la purificación de la proteína recombinante marcada con 6xHis, como se muestra en la Figura 26, al adicionar imidazol este rompe las uniones que la histidina tiene con el Níquel, liberando poco a poco los residuos de histidina, quedando el imidazol unido al Níquel.

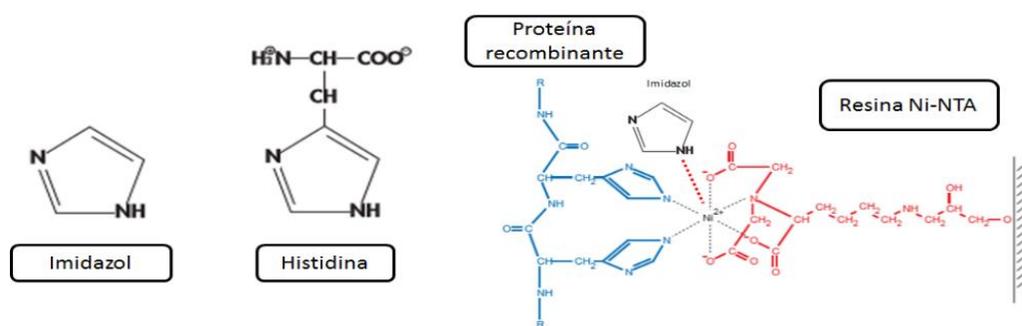


Figura 26 Interacción de la resina con la proteína recombinante. En la imagen a la izquierda se muestra el imidazol y la Histidina los cuales como se logra apreciar son análogos; en la imagen de la derecha se aprecia la unión que hace la resina con los residuos de Histidina y, cuando se adiciona el Imidazol, la nueva unión que se hace, facilita la liberación de los residuos de Histidina.

5.8.1 Protocolo de purificación para proteínas con afinidad al Níquel (BATCH)

Después de la calibración de la resina que consiste en la adición del buffer de lisis (ver anexo 23) se dejó un periodo de agitación de 10 min a 250 rpm en la incubadora a 4 °C, colectando finalmente la pastilla la cual contiene la resina calibrada, se adicionaron 600 µl de lisado y se incubó esta mezcla 60 min a 250 rpm a 4 °C. El uso de imidazol en baja concentración (10 mM) en el buffer de lisado y en el buffer de calibración permite que la unión que se hace entre la proteína y la resina no sea tan fuerte en el momento de la unión ya que el imidazol ocupa enlaces con el Níquel. Esto permitió que en la elución no se requiera una concentración de imidazol elevada para poder eluir la proteína, dado que altas concentraciones de imidazol pueden llegar a desnaturizar la proteína recombinante y desestabilizarla. Para el lavado de la proteína fueron usados 400 µl de buffer de lavado (ver anexo 24). El número de lavados

depende de que tan pura se requiera la proteína, para este caso se realizarán de 2-4 lavados y las fracciones se analizarán por SDS-PAGE.

5.9 Electroforesis en gel de poliacrilamida

La electroforesis de proteínas en geles con una matriz de poliacrilamida, comúnmente denominada electroforesis en poliacrilamida (PAGE, polyacrilamide gel electrophoresis) es una técnica comúnmente usada para caracterizar mezclas complejas de proteínas. Es un método conveniente, rápido y económico a nivel de muestra pues se requieren cantidades pequeñas de muestra. Fue descrito por Laemmli (1970).

5.9.1 Preparación del gel de poliacrilamida

Se realizó un gel de poliacrilamida al 10% (ver anexo 37). Se cargaron 25 µl de la muestra más 6.5 µl de Buffer de muestra 5X (ver anexo 38), y fueron hervidas durante 5 min. Se colocaron los geles en la cámara y se dejó correr a 190 V durante un aproximado de 1 hora y 40 min a 4°C, posteriormente se separaron cuidadosamente los vidrios y se procedió a teñir. Cabe destacar que para realizar Western Blot los geles no serán teñidos.

6. Resultados

6.1 Objetivo 1: Clonar el gen de la RNA helicasa dependiente de ATP hrpB en el vector de clonación pBluescript SK+.

Para clonar y expresar la proteína RNA-HEL se siguió un protocolo de dos pasos. El primer paso consistió en la clonación del gene en el vector pSK y a partir de esta construcción se obtuvo el inserto para el segundo paso, que fue la clonación en el vector de expresión pQE-31 (QIAGEN).

El primer paso, correspondiente al objetivo 1, se ha concluido obteniendo como resultado la construcción de pSK-HEL, después de ligar el gen al vector de clonación pSK+ se obtuvieron los resultados mostrados en la figura 27. Partimos de la selección de colonias blancas de las

azules, se obtuvieron 22 colonias blancas transformadas, mismas que fueron sembradas en caja y tubo para realizar una extracción de plásmido.

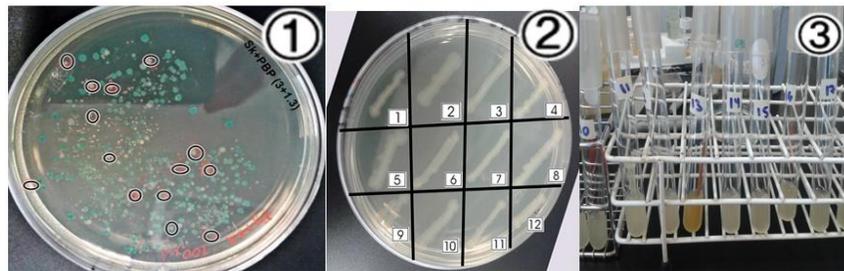


Figura 27 Selección de candidatos. 1) Se muestra la selección de colonias blancas de las de azules (22 colonias blancas), 2) y 3) se muestra la siembra en caja y tubo para posteriormente realizar extracción de plásmido y corroborar las clonas positivas por medio de restricción enzimática.

6.1.1 Selección de candidatos por perfil de restricción

Para seleccionar el candidato positivo se realizó una digestión para linealizar al plásmido con la enzima EcoRI, corroborarlo con el peso esperado de 5.7 Kb (3 Kb de vector + 2.7 Kb de inserto) como se muestra en la Figura 28. Se seleccionaron los candidatos positivos; posteriormente, se les realizó una segunda digestión con la enzima SmaI para liberar el inserto y de esta manera se obtuvieron dos bandas: una banda con el tamaño del vector (3 Kb) y otra con el tamaño del inserto (2.7 Kb) Figura 28B.

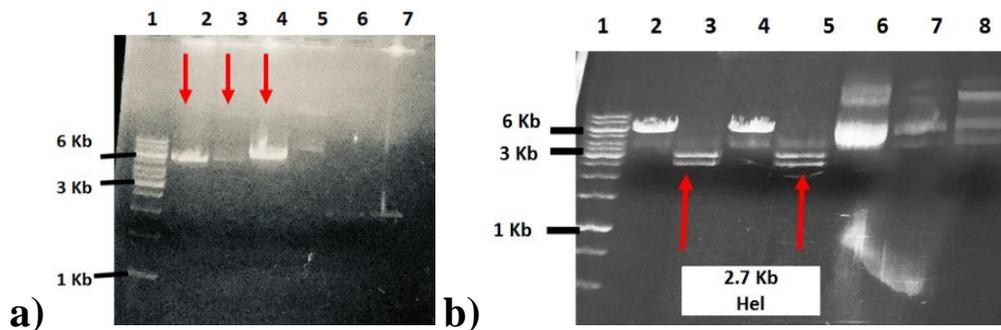


Figura 28 Gel para seleccionar candidatos por peso molecular. A) En el gel se muestra la primera digestión realizada a los candidatos con la enzima EcoRI, el carril 1) MPM, del carril 2-7 son candidatos, carril 2, 3 y 4 se seleccionaron como positivos con un tamaño de 5.7 Kb. B) carril 1) MPM, carril 2) candidato positivo digerido con EcoRI (5.7 Kb); carril 3) mismo candidato digerido con EcoRI/SmaI (3 Kb de vector y de 2.7 Kb del inserto); carril 4) candidato positivo digerido con EcoRI (5.7 Kb); carril 5) mismo candidato digerido con EcoRI/SmaI (3 Kb de vector y 2.7 Kb del inserto); carriles 6, 7 y 8 controles negativos sin digerir de los candidatos positivos.

6.2 Construcción de pSK-HEL

A continuación, en la Figura 29 se muestra el mapa de la construcción de la clona portadora del gen de la RNAHel, que posee un tamaño de 5687 pb, de las cuales 2743 pb corresponden al tamaño del inserto que esta flanqueado por las enzimas EcoRI en el extremo 5', y con SmaI en el extremo 3'. Cabe destacar que con esta construcción el gen conserva tanto su promotor como su codón de inicio.

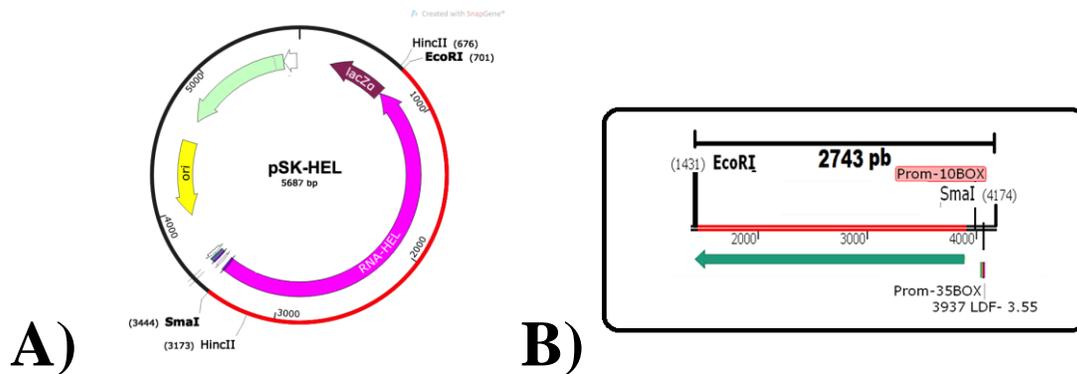


Figura 29 Construcción de pSK-HEL. La construcción posee un tamaño de 5 687 pb, en la línea roja se muestra el tamaño del inserto que se encuentra flanqueado por las enzimas con las que se ligó EcoRI y SmaI.

6.3 Determinación de la actividad de la RNA-HEL

En un siguiente paso, se evaluó la actividad tóxica de dicha construcción mediante bioensayos de inyección en *Phyllophaga sp* con sobrenadantes de cultivo libres de bacteria. En un primer bioensayo se observó un máximo de mortalidad de 100% (P<0.0001 comparado con el control de H₂O y vector vacío) al día 7 de iniciado el bioensayo con la inyección de 50 µg de proteína/larva de sobrenadante de cultivo (Figura 30, panel B (separar la figura en panel A y B)).

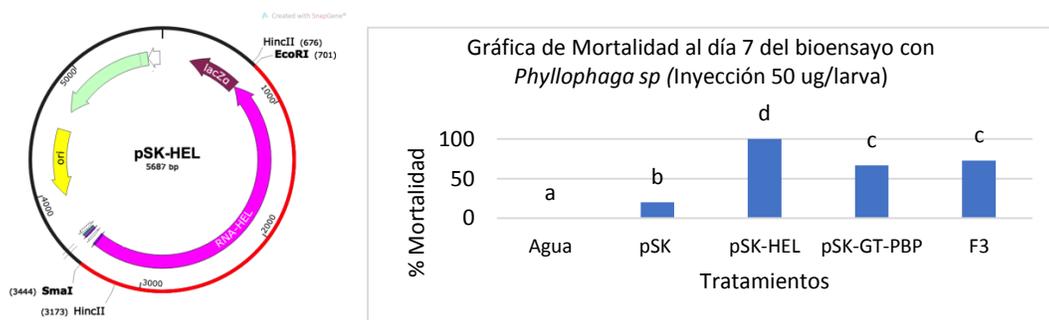


Figura 30 pSK-HEL lado izquierdo: construcción de pSK-HEL tamaño de 5.6 Kb. Lado derecho: Gráfica de Mortalidad al día 7 del bioensayo con *Phyllophaga sp* ($P < 0.0001$) ($N = X$). Letras diferentes sobre las barras representan diferencias significativas en base a tablas de contingencia y la prueba estadística χ^2 .

Con la finalidad de comparar la actividad de las dos proteínas juntas y por separado, se determinó la Dosis Letal 50 (DL50) de F3, pSK-Hel y E9 (construcción con el dominio GT-PBP). La DL50 se define como la dosis capaz de matar a la mitad de la población; entre más pequeña es la DL50 más tóxica es una sustancia. Se inyectaron diferentes grupos de larvas de *Phyllophaga* con concentraciones proteicas de cultivos de 72 h de los tratamientos mencionados anteriormente. Las concentraciones utilizadas fueron las siguientes: dosis de 50 μg , 30 μg , 20 μg , 10 μg , 5 μg y 0 μg .

En la gráfica 31 se muestra el bioensayo de inyección con larvas de *Phyllophaga sp* con el tratamiento de F3 en donde se tienen las dos regiones genéticas (RNA-HEL y GT-PBP), mediante el cual se observó un máximo de mortalidad del 100% al día 10 del bioensayo.

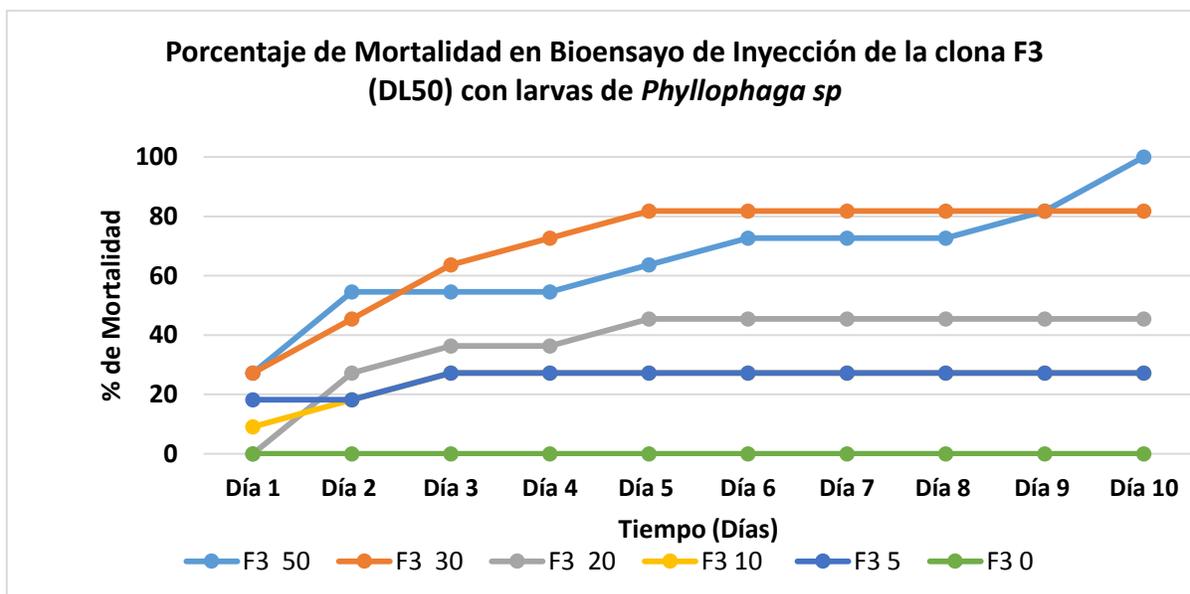


Figura 31 Gráfica F3; porcentaje de mortalidad en bioensayo de inyección con sobrenadantes libres de bacterias de la clona F3 (DL50) con larvas de *Phyllophaga sp*. Se utilizaron las concentraciones 50 $\mu\text{g/larva}$; 30 $\mu\text{g/larva}$; 20 $\mu\text{g/larva}$; 10 $\mu\text{g/larva}$; 5 $\mu\text{g/larva}$; y 0 $\mu\text{g/larva}$. $N = 11$.

En la gráfica 32 se muestra el bioensayo de inyección con larvas de *Phyllophaga sp* con el tratamiento de HEL (Sobrenadante de la construcción pSK-HEL) en donde se tiene el gen de la RNA-HEL intacto con su propio promotor, mediante el cual se observó un máximo de mortalidad del 100% al día 7 del bioensayo.

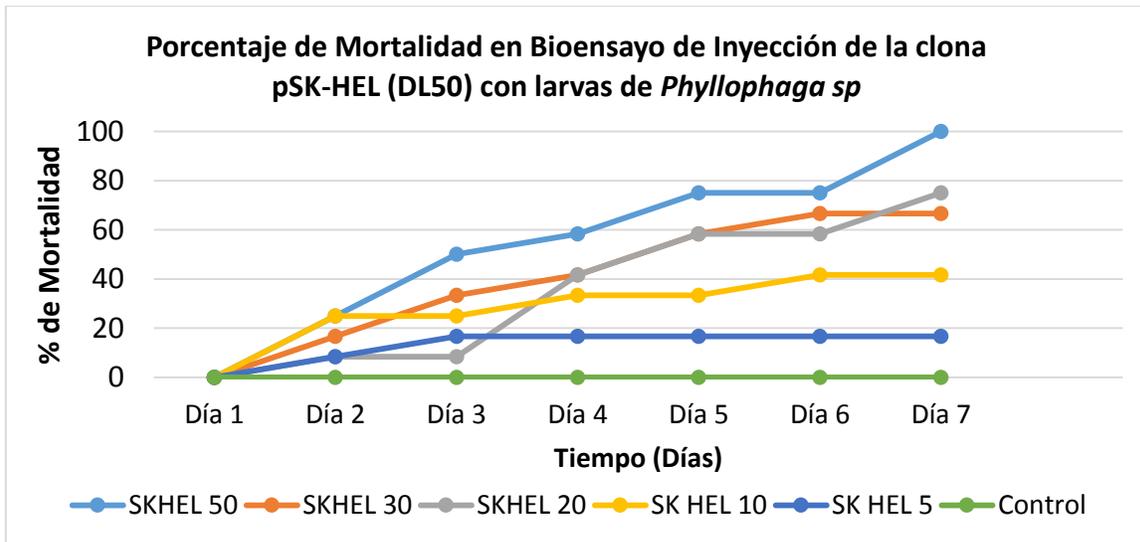


Figura 32 Gráfica pSK-HEL, porcentaje de mortalidad en bioensayo de inyección con sobrenadantes libres de bacterias de la clona pSK-HEL (DL50) con larvas de *Phyllophaga sp*. Se utilizaron las concentraciones 50 µg/larva; 30 µg/larva; 20 µg/larva; 10 µg/larva; 5 µg/larva; y 0 µg/larva. Con una N de 12 larvas.

En la gráfica 33 se muestra el bioensayo de inyección con larvas de *Phyllophaga sp* con el tratamiento de GT-PBP (sobrenadante de la construcción E9) en donde se tiene el gen de GT-PBP, mediante el cual se observó un máximo de mortalidad del 100% al día 15 del bioensayo.

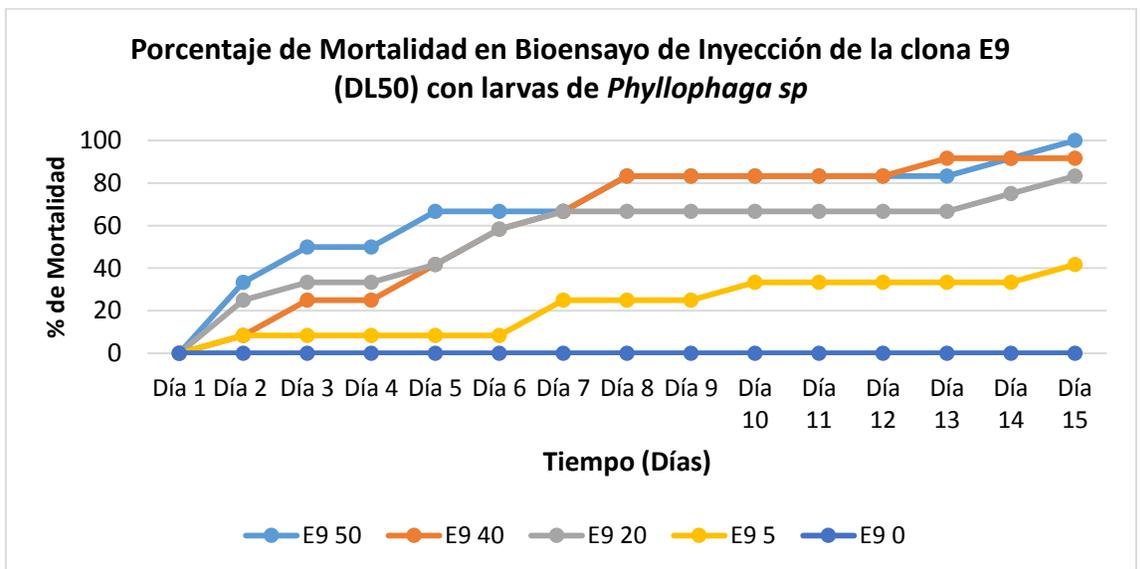


Figura 33 Gráfica E9; porcentaje de mortalidad en bioensayo de inyección con sobrenadantes libres de bacterias de la clona E9 (DL50) con larvas de *Phyllophaga sp*. Se utilizaron las concentraciones 50 µg/larva; 40 µg/larva; 20 µg/larva; 5 µg/larva; y 0 µg/larva. Con una N de 12 larvas.

Se analizaron los datos de mortalidad en el programa Polo Plus (Figura 34), y mediante un análisis Probit se determinaron las siguientes DL50: F3 20.159 μg / larva (Intervalo de confianza 95% 10.451, tratamiento E9 24.375 μg /larva (Intervalo de confianza 95% 12.019) y tratamiento RNA-HEL 18.661/larva μg ((Intervalo de confianza 95% 10.268).

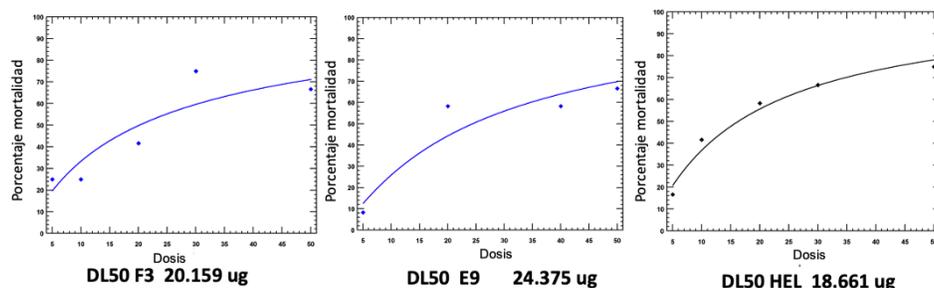


Figura 34 Curva de DL50 por el programa Polo Plus, se muestran las curvas obtenidas en el programa Polo Plus.

6.4 Objetivo 2 Clonar el gen de la RNA-HEL, en un sistema de expresión.

Como resultado del segundo objetivo se obtuvo la construcción de la clona p31-HEL. Después de la ligación se seleccionaron colonias blancas que se sembraron en caja y tubo para obtener plásmidos y analizarlos por perfil de restricción. Se realizó una digestión con la enzima Hind III en candidatos para así linealizar la construcción y por peso seleccionar los candidatos positivos, los cuales debían poseer un peso de 5.9 Kb correspondiente al tamaño de la construcción y otra banda de 3.7 Kb correspondiente al plásmido pREP4 de M15 con un peso de 3.7 Kb (Figura 35 A). Como segundo paso se realizó una doble digestión con la enzima SmaI, para obtener tres bandas con pesos de 2.6 Kb del inserto y dos bandas muy juntas una de 3.4 Kb del vector pQE31 y otra de 3.7 Kb del plásmido pREP4, como se muestra en el gel en la Figura 35 B.

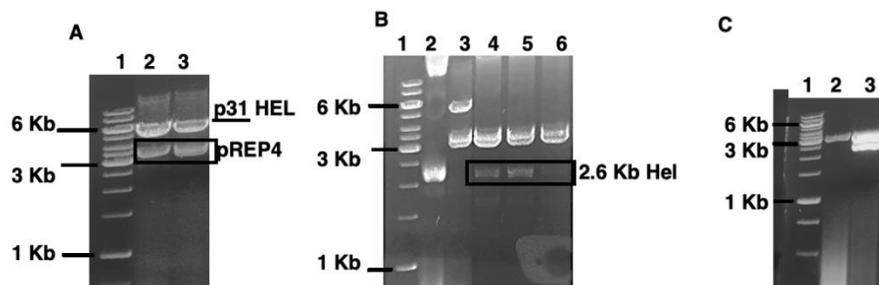


Figura 35 Gel de agarosa al 1% con los candidatos positivos. A) digestión con HindIII para linealizar los candidatos 5.9 Kb (vector-inserto) y otra de 3.7 vector pREP4. Carril 1) MPM 1 Kb ladder, carril 2) candidato 1 + HindIII; carril 3) candidato 2 + HindIII, ambos candidatos positivos.

B) segunda digestión HindIII/SmaI; carril 1) MPM 1 Kb ladder, carril 2) candidato sin digerir; carril 3) candidato (negativo); carril 4) candidato 1 digerido con HindIII/SmaI (positivo), carril 5) candidato 2 digerido con HindIII/SmaI (positivo); carril 6) candidato 3 HindIII/SmaI (positivo). C) Segunda clonación para eliminar pREP4; carril 1) MPM 1 Kb ladder; carril 2) vector pQE31 que se utilizó como control negativo, carril 3) construcción sin pREP4 en cepa TOP10, se tienen dos bandas una de 3.4 Kb vector, y otra de 2.6 Kb de la RNA-HEL.

6.4.1 Construcción p31-RNA-HEL

A continuación, en la Figura 36 se muestra la construcción de la clona p31-HEL así como también los sitios de restricción más importantes. Como un paso previo a la expresión y la purificación de la proteína recombinante se procedió a realizar una segunda clonación para eliminar el plásmido pREP4 el cual contiene la cepa de expresión de la M15 para enviar a secuenciar y eliminar la interferencia creada por dicho plásmido y así comprobar que la construcción se encuentra en un marco de lectura abierto y correcto. Posteriormente se realizó un gel de agarosa con la finalidad de comprobar la eliminación del plásmido pREP4 (Figura 35 C) transformado en la cepa Top 10 de *E. coli*, digerido con la enzima HindIII y SmaI que corta tanto en la construcción como en el plásmido pREP4.

Se enviaron 2 candidatos a la Unidad de Síntesis del Instituto de Biotecnología (IBT), en ambos casos se obtuvo como resultado un aproximado de 1 Kb mismas que fueron alineadas para corroborar que el marco de lectura quedó en fase.

A continuación, en la Figura 37 se observa el alineamiento de las dos construcciones mostradas con las flechas rojas. Con este resultado concluimos que la construcción quedó en fase y además cuenta con los elementos mínimos necesarios para su expresión.

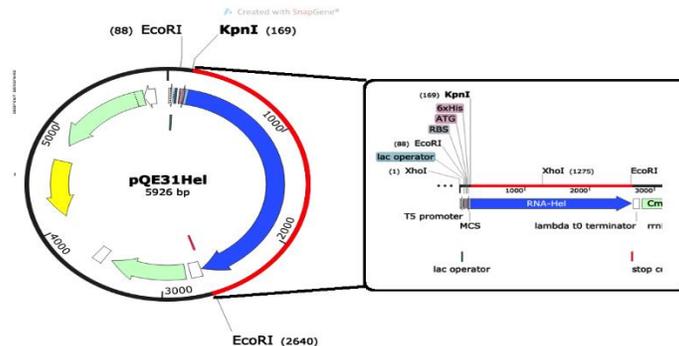


Figura 36 Construcción p31-HEL. Cuenta con un tamaño de 5926 pb, flanqueada en el extremo 5' con la enzima KpnI y en el extremo 3' con EcoRI, cabe destacar que en esta construcción el gen de la RNA-HEL se encuentra en un vector de expresión como se observa de lado derecho en el panel agrandado, la construcción se encuentra en fase y contiene los requerimientos mínimos necesarios para una expresión de la proteína recombinante exitosa.



Figura 37 Alineamiento de los candidatos secuenciados. En la figura superior en la línea principal se encuentra toda la construcción de p31-HEL virtual esperada, mientras que en las flechas rojas se muestran los dos candidatos alineados. En la figura inferior se realizó un acercamiento para corroborar que no se rompió el marco de lectura.

6.4.2 Inducción de la proteína RNA-HEL en sistema de vectores de expresión pQE

Previo a la purificación de la proteína se deben estandarizar las condiciones para su óptima expresión. De acuerdo con lo sugerido por el proveedor (QIAGEN) en cada experimento de inducción se realizó un cambio en las condiciones de crecimiento para detectar las mejores condiciones para un mayor rendimiento, sin embargo, no fue lograda la expresión de la proteína. Los cambios realizados fueron los siguientes: Tiempo de la expresión desde 6 h hasta 32 h, Temperatura de 37° C a 30° C, concentración de IPTG de 1 mM a 2 mM, cambio de buffers para el lisado celular nativos, desnaturizantes (urea y guanidina) y lisis por sonicación.

A continuación, en la Figura 37 se muestra el análisis de fracciones por SDS-PAGE con buffer desnaturizante (urea), se observa un mayor patrón de bandas ya que se rompe completamente la membrana celular, y se desnaturizan las proteínas que se encuentran en la bacteria así como posibles cuerpos de inclusión, al realizar el análisis y comparar con el control (vector vacío) no se observaron cambios y tampoco se apreció ninguna banda sobre-expresada con el peso de la proteína recombinante esperado de 54 kDa.

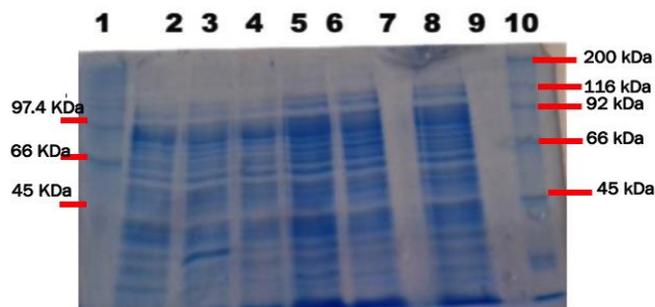


Figura 38 Gel de acrilamida al 10% con fracciones de lisis desnaturalizante, condiciones de crecimiento: 30° C a 1 mM y 2 mM de IPTG y un tiempo de cultivo de 30 y 36 h. carril 1) MPM alto, carril 2) HEL inducida con 2 mM IPTG 30 h de inducción, carril 3) HEL 1 mM IPTG y 30 h de inducción; carril 4) HEL inducida con 2 mM IPTG y 36 h de inducción; carril 5) HEL 1 mM IPTG y 36 h de inducción, carril 6) control vector vacío 1 mM IPTG y 30 h de inducción; carril 7) vacío; carril 8) control HEL sin IPTG y 30 h de crecimiento, carril 9) vacío; carril 10) MPM bajo.

Los experimentos no mostraron expresión de la proteína, por lo que se decidió buscar un nuevo sistema de expresión, debido a que en el Laboratorio de Patogenicidad es indispensable estandarizar un sistema de expresión de proteínas para poder usarlo en experimentos posteriores. Buscamos el sistema de expresión que contuviera las características adecuadas para una expresión de proteínas recombinantes y fácil obtención bajo condiciones nativas para obtener la proteína plegada adecuadamente, y que al mismo tiempo etiquete la proteína para que la purificación sea sencilla.

5.4.3 Construcción pTZ-HEL

El producto de PCR que codifica para la RNA-HEL flanqueado por los sitios NcoI y NotI fue ligado al vector pTZ57R/T (kit de clonación de PCR InsTAclone), obteniendo la construcción pTZ-HEL de 5.6 Kb (Fig. 38, derecha), para continuar con el siguiente paso de la clonación en el vector de expresión pET-22b(+). Se realizó la digestión en la construcción pTZ-HEL con NcoI; se esperaba el plásmido linealizado con el tamaño de 5.6 Kb, sin embargo, esto no sucedió. Se procedió a secuenciar la construcción y corroborar la secuencia para detectar cambios asociados con el fallo en la digestión con NcoI.

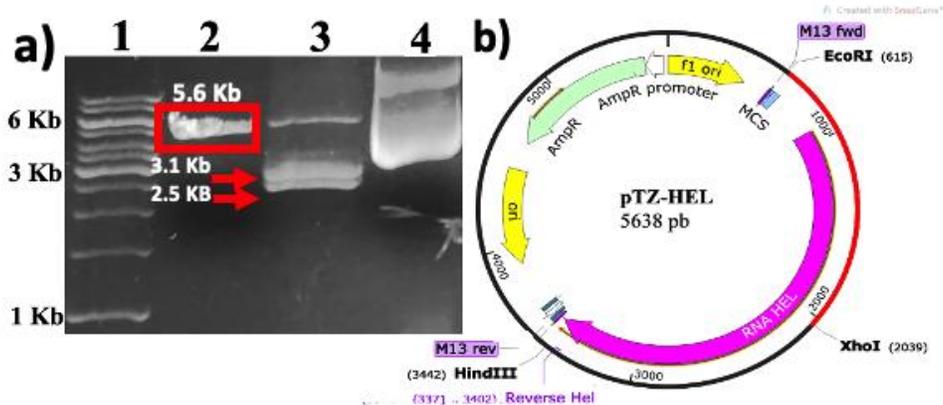


Figura 39 Construcción pTZ-HEL, gel de lado izquierdo: carril 1) MPM; carril 2) pTZ-HEL digerido con XhoI (5.6 Kb); carril 3) pTZ-HEL digerido con EcoRI y HindIII (3.1 Kb vector y 2.5 inserto); carril 4) pTZ-HEL control sin digerir. De lado derecho: construcción pTZ-HEL se señalan los sitios con los que se corroboró la construcción por perfil de restricción (HindIII, XhoI y EcoRI), también se señala la región de los oligos M13 con los que se envió a secuenciar.

5.4.3.1 Secuenciación de pTZ-HEL

Para la secuenciación se utilizaron los primers comerciales M13/PUC reverse 5'-(CAGGAAACAGCTATGAC)-3' y M13 Forward 5'-(GTTTTCCCAGTCACGAC)-3'. En la figura 40 A se muestran los resultados de la secuenciación. Se observa en el extremo 5' (con el sitio sintético NcoI), una secuencia de 101 pb con mala calidad. Con tales resultados no fue posible hacer una comparación con la secuencia virtual esperada, tampoco fue posible comprobar la existencia del sitio NcoI en el producto de PCR en el extremo 5'. El resultado obtenido de la secuenciación en el extremo 3' con el sitio sintético NotI, mostró una secuencia de buena calidad en un fragmento de 741 pb (Fig. 40 B); se realizó el análisis y se comprobó que el producto de PCR coincidía con la secuencia virtual esperada.

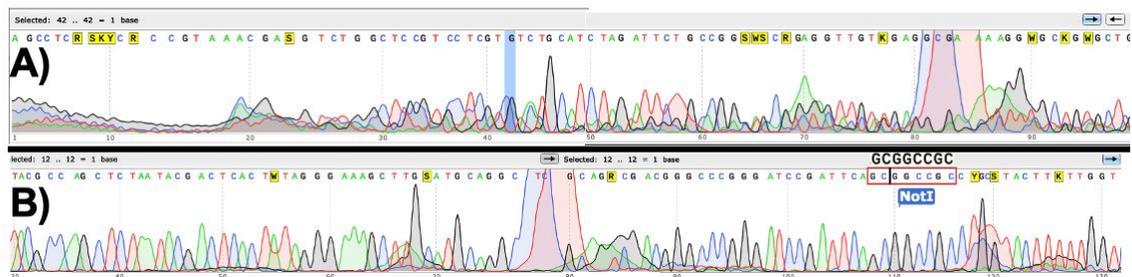


Figura 40 Diagrama de secuenciación, A) secuenciación en el extremo 5' con el sitio sintético NcoI, se obtuvo una secuencia de 101 pb. B) secuenciación en el extremo 3' con el sitio sintético NotI, se obtuvo una secuencia de 741 pb.

5.2.4 Construcción de pTZ/SK-HEL

Con esta construcción fue posible eliminar la secuencia defectuosa del extremo 5', además conservo en el extremo 3' el sitio sintético añadido NotI. Después de la reacción de ligación se obtuvo la construcción pTZ/SK-HEL de 5.6 Kb portadora del gen de la RNA-HEL con un tamaño de 2.6 Kb, (Figura 39 B), para corroborarla por perfil de restricción se realizó una digestión con la enzima XhoI para linealizar el plásmido (5.6 Kb); se realizó una segunda digestión con la enzima NotI con este corte se esperan dos bandas con pesos de 1.3 Kb (correspondiente a la mitad del gen del extremo 5' con el sitio sintético añadido de la enzima NotI) y 4.3 Kb (correspondiente a la mitad del gen del extremo 3' y al vector pSK). Con esta construcción es posible continuar con el siguiente paso que es la clonación en el sistema de expresión pET y así poder hacer uso de enzimas de restricción apropiadas para la ligación y fusionar el gen con el vector.

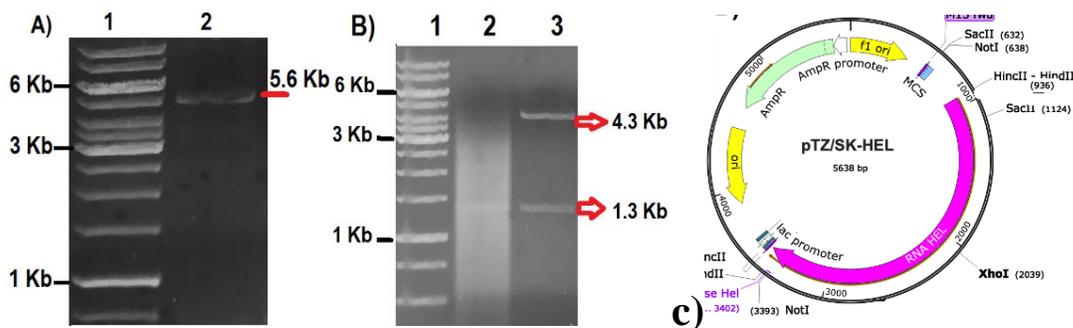


Figura 41 Construcción pTZ/SK-HEL, A): carril 1) MPM 1 Kb ladder, carril 2) candidato 1 linealizado con tamaño de 5 638 pb; B): carril 1) MPM 1 Kb ladder, carril 2) candidato 1 sin digerir, carril 3) candidato 1 digerido con XhoI y NotI dos bandas con tamaños de 1.3 Kb y otra de 4.3 Kb.

5.2.5 Construcción de la RNA-HEL en pET-22b (+)

Se realizó una digestión en el vector pET-22b con las enzimas NotI y Eco53kI; para obtener el inserto se utilizó la construcción pTZ/SK-HEL digerida con las enzimas NotI/HincII. Ambas digestiones se complementan entre sí para fusionar la proteína en el N-terminal con el péptido señal del vector y en el C-terminal con los 6xHis del mismo. De esta manera se obtiene un marco de lectura abierto y correcto. El resultado fue la construcción pET22-HEL con un tamaño de 7.9 Kb (Figura 42). El gen quedó fusionado en el extremo 5' con el péptido señal del vector pelB y el extremo 3' con la etiqueta de 6xHis.

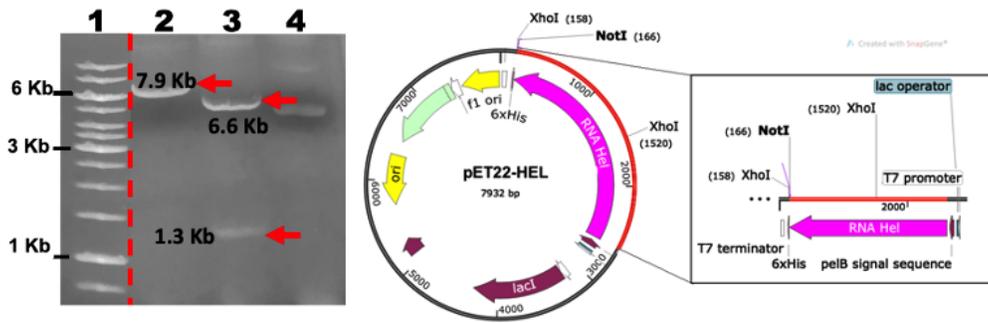


Figura 42 Construcción pET22-HEL, gel de agarosa de lado izquierdo: carril 1) MPM; carril 2) pET22-HEL digerido con XhoI (7.9 Kb); carril 3) pET22-HEL digerido con XhoI/NotI (6.6 Kb; (5.4 Kb del vector más 1.2 Kb del inserto); 1.3 Kb mitad restante del inserto); carril 4) pET22-HEL sin digerir. Lado derecho: construcción pET22-HEL).

5.5.1 Secuenciación de pET22-HEL

Se envió a secuenciar la construcción pET22-HEL con el primer T7 (5'-TAATACGACTCA CTATAGGG-3'). Se obtuvo una secuencia de 930 pb (figura 43). Los resultados mostraron que el marco de lectura en el extremo 5' es correcto y la proteína recombinante que contiene el gene codificante para la HEL, se había fusionado con el péptido señal (pelB) de manera correcta.

Con estos resultados se concluyó la clonación de la HEL en el vector de expresión pET-22b. Sin embargo, se menciona que aún falta corroborar la secuencia del extremo 3', para continuar con el paso siguiente relativo a la estandarización de la expresión e inducción de la proteína recombinante. Se enfatiza que el patrón de digestión con las enzimas NotI y XhoI fue correcta como se indica en la figura 42 (Gel de agarosa lado izquierdo).

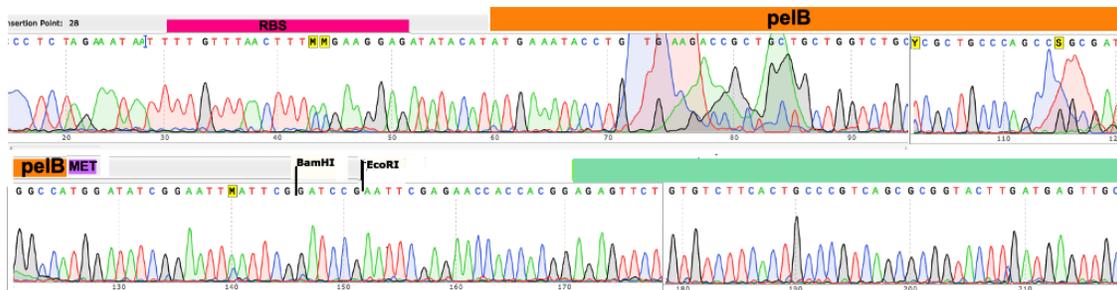


Figura 43 Diagrama de secuenciación pET22-HEL. Se muestra la secuencia obtenida, se señala en los recuadros a colores las secuencias consenso, de igual manera en la línea verde señala el lugar donde se ligó el inserto de HEL al vector y la secuencia correspondiente al gen.

5.6 Construcción de pET-GT-PBP

Después de la ligación se obtuvo la construcción pET22-GT-PBP de 6.8 Kb, portadora del gene de GT-PBP flanqueado por los sitios Hind III y EcoRI (Figura 44 lado derecho). Se realizó la digestión primeramente con la enzima Hind III para linealizar al plásmido, y posteriormente una segunda digestión para separar al vector del inserto con la enzima EcoRI y Hind III, se esperaban dos bandas una de 1.3 Kpb correspondiente al inserto y otra de 5.4 Kpb correspondiente al vector; en la figura 44 se muestra el gel con las digestiones mencionadas anteriormente en dos candidatos positivos aislados, mismos que fueron comparados con la construcción pQE-GT-PBP de donde fue obtenido el inserto para comparar el tamaño del inserto portador del dominio GT-PBP.

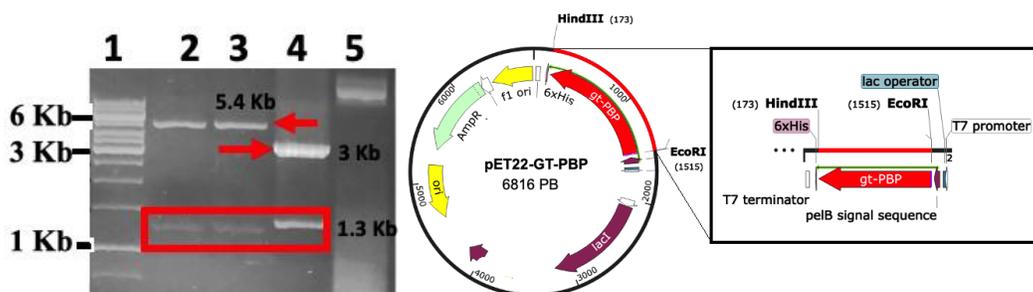


Figura 44 Construcción pET22-GT-PBP, gel de lado izquierdo: carril 1) MPM; carril 2 y 3 construcción pET22-GT-PBP digerida con HindIII/EcoRI (vector 5.4 Kb, inserto 1.3 kb); carril 4) pQE-GT-PBP digerida con EcoRI/HindIII (tamaño del inserto 1.3 Kb). Lado izquierdo: se muestra la construcción que tiene un tamaño de 6816 pb, y el gen flanqueado con HindIII en el extremo correspondiente al C-terminal y con EcoRI en el extremo correspondiente al N-terminal.

5.6.1 Secuenciación pET22-GT-PBP

Como un paso previo a la inducción de la proteína, la construcción pET22-GT-PBP se envió a secuenciar con el primer T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'). Se obtuvo una secuencia de 1117 pb (Fig. 45). Se observó, que el marco de lectura quedó en fase por lo que se decidió continuar con el siguiente paso de la expresión. El análisis por restricción con las enzimas EcoRI y HindIII sugiere que la construcción es correcta (Fig. 44; gel de agarosa lado izquierdo).

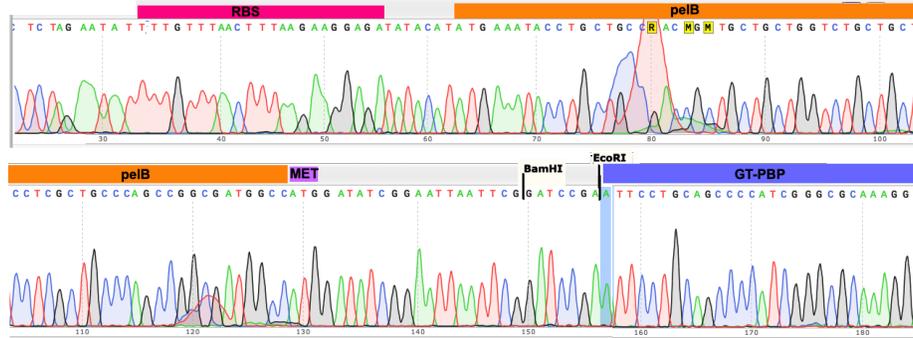


Figura 45 Diagrama de secuenciación pET22-GT-PBP. Se muestra la secuencia obtenida, se señala en los recuadros a colores las secuencias consenso, y además el sitio EcoRI donde se ligó el inserto al vector y lo que corresponde a la secuencia de GT-PBP.

5.7 Objetivo. 3: Purificar la proteína RNA-HEL y el dominio GT-PBP, en su forma nativa con columnas de afinidad.

5.3.1 Estandarización de condiciones de cultivo y purificación. Inducción de la proteína.

Se analizaron 7 candidatos positivos en BL21 (DE3) para seleccionar el mejor candidato capaz de producir el mayor rendimiento del dominio GT-PBP. Se evaluaron diferentes condiciones de inducción con respecto a temperatura (25° y 30°C) y concentración de IPTG (0.5 y 1 mM) según lo reportado (Saida et al., 2). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en los geles de proteínas obtenidos en las diferentes condiciones de acuerdo con el tamaño de la proteína GT-PBP esperada (55 kDa).

En la figura 46 se muestran los resultados de la expresión de los 7 candidatos. Las condiciones de inducción en este experimento fueron 30°C y 1 mM de IPTG.

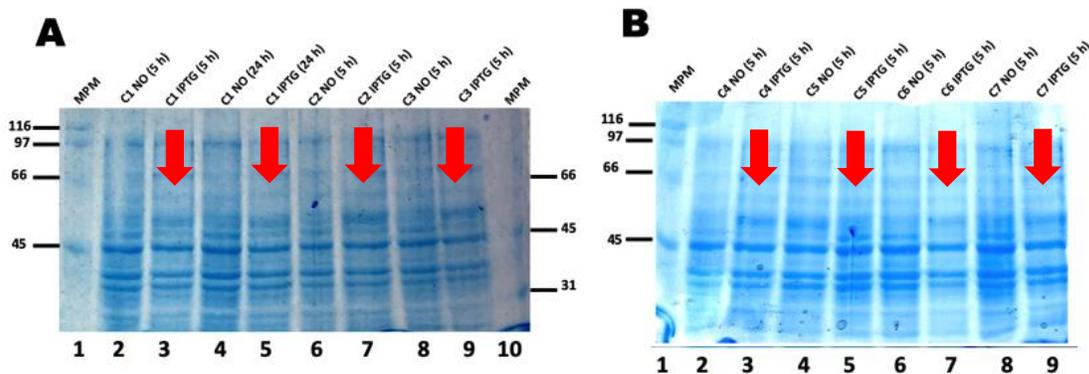


Figura 46 Análisis de fracciones totales de los 7 candidatos positivos en BL21 (DE3) inducidos a 30°C con 1 mM IPTG, 5 horas después de inducir y 24 horas después de la inducción; A):

carril 1)MPM alto; carril 2) C1 sin inducir (5 h); carril 3) C1 inducido (5 h), carril 4) C1 sin inducir (24 h); carril 5) C1 inducido (24 h); carril 6) C2 sin inducir (5 h); carril 7) C3 inducido (5h); carril 8) C3 sin inducir (5 h); carril 9) C3 inducido (5h); carril. B): carril 1) MPM alto; carril 2) C4 sin inducir (5 h); carril 3) C4 inducido (5 h); carril 4) C5 sin inducir (24 h): carril 5) C5 inducido (24 h); carril 6) C6 sin inducir (5 h); carril 7) C6 inducido (5h); carril 8) C7 sin inducir (5 h); carril 9) C7 inducido (5h). En las flechas rojas se señala el peso esperado de GT-PBP de 54 KDa.

Por otra parte, se ha reportado que la expresión de algunas proteínas, en particular toxinas, podrían afectar negativamente el crecimiento del cultivo bacteriano (Li et al., 2017), afectando de esta manera el rendimiento de la proteína recombinante. Dicha expresión podría estar afectada por la concentración de IPTG en el medio de cultivo. Para determinar la concentración adecuada de IPTG para la expresión de la proteína GT-PBP, se determinó la cinética de crecimiento después de inducir con dos concentraciones del inductor IPTG, 0.5 mM y 1 mM. Paralelamente, también se determinó la cinética del cultivo no inducido como control. En la figura 47 se muestran los resultados de la cinética de crecimiento a una temperatura de inducción de 25° C. El monitoreo se realizó durante las primeras 9 horas de crecimiento.

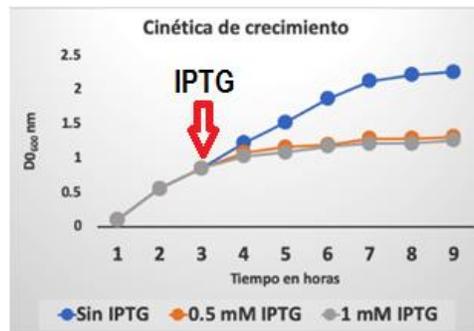


Figura 47 Cinética de crecimiento, 9 horas de crecimiento bacteriano, en la línea azul se muestra el comportamiento del control sin inducir, línea naranja control 0.5 mM IPTG, línea gris 1 mM de IPTG. En la flecha color rojo se muestra en el tiempo en el que fueron inducidos los cultivos, después de alcanzar la DO₆₀₀ de 1.0.

Estos resultados sugieren que existe una disminución del crecimiento de bacterias cuando se añade el inductor, en comparación con el control sin inducir. Esta disminución podría estar asociada con el gasto energético de la expresión “en exceso” de la proteína recombinante. Otra posibilidad es que la proteína podría tener toxicidad hacia la misma bacteria por lo que disminuye el crecimiento bacteriano. Similares resultados se han observado en la expresión

de otras proteínas con actividad tóxica (Li et al., 2017). No hubo diferencias en la cinética de crecimiento entre las dos concentraciones de IPTG utilizadas 0.5 mM y 1 mM.

5.7.1 Purificación de GT-PBP

Se realizó una extracción de proteínas del periplasma por choque osmótico (con una fracción inducida sin concentrar). La purificación se realizó en BATCH en un tubo eppendorf, como se indica en materiales y métodos. El resultado de esta purificación se muestra en la Figura 48, donde se observa una proteína parcialmente purificada con el peso de aproximadamente 54 kDa.

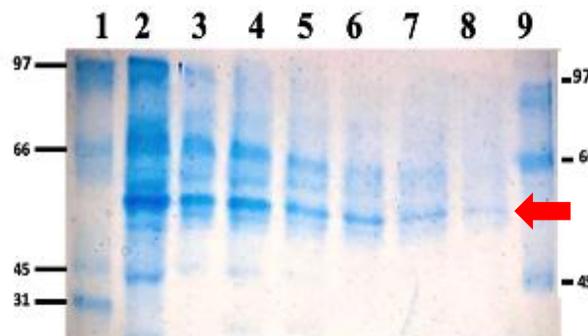


Figura 48 Purificación de la proteína recombinante. 1) MPM alto; 2) Fracción periplasma total; 3) Fracción después de la unión a la resina; 4) Lavado 1 a 10 mM Imidazol; 5) Lavado 2 a 20mM Imidazol; 6) Lavado 3 a 20 mM Imidazol; 7) Elución 1 a 300 mM Imidazol, 8) Elución 2 a 300 mM de imidazol 9) MP en la flecha roja se señala el peso esperado de GT-PBP de 54 KDa.

5.8 Expresión de la RNA-HEL

La expresión óptima de las proteínas recombinantes en los sistemas de expresión requiere de ensayos para encontrar las condiciones para su óptima expresión y así tener un mayor rendimiento (Al-Hejin *et al.*, 2019). Para la expresión de la RNA-HEL se evaluaron diferentes cambios en las condiciones de crecimiento: a) tiempos después de la inducción, desde 5 horas hasta 12 h después de agregar el inductor; b) temperatura de inducción, de 37 °C, 30 °C, 25 °C y 16 °C. Cabe destacar que se realizó un cambio en cada ensayo, para poder detectar las diferencias en cada una de las condiciones. No se observaron diferencias en las proteínas observadas en las diferentes condiciones en geles de poliacrilamida. En la figura 49 se muestra el ensayo realizado a 16 °C; 0.5 mM de inductor IPTG; 12 horas después de la

expresión. Se realizó la extracción de proteínas del periplasma por choque osmótico como se describe en Materiales y Métodos. En la figura 49 se muestran las fracciones que se obtuvieron después del ensayo. Se observa la fracción hipotónica (flecha negra) y la hipertónica (flecha roja). No se observan cambios en las proteínas según el tamaño esperado de la proteína recombinante.

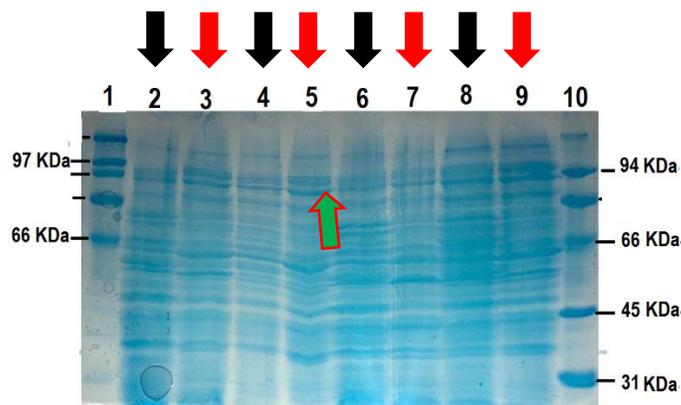


Figura 49 Gel de acrilamida al 10% con fracciones del periplasma (TCA) carril 1) MPM alto; carril RNA-HEL sin inducir (buffer SET; flecha negra); carril 3) RNA-HEL sin inducir (Buffer MgSO₄; flecha roja); carril 4) RNA-HEL inducido (buffer SET; flecha negra); carril 5) RNA-HEL inducido (Buffer MgSO₄; flecha roja; la flecha verde señala el peso esperado de la RNA-HEL (94 KDa); carril 6) control vector vacío sin inducir (buffer SET; flecha negra); carril 7) control vector vacío sin inducir (Buffer MgSO₄; flecha roja); carril 8) control vector vacío inducido (buffer SET; flecha negra); carril 9) control vector vacío inducido (Buffer MgSO₄; flecha roja); carril 10) MPM bajo.

Como un aspecto importante de la expresión de proteínas es realizar un análisis de los sobrenadantes para observar alguna posible fuga de la proteína hacia el espacio extracelular. Se tomó 1 ml del sobrenadante libre de bacterias (SB) y se concentró con TCA, en la figura 50 se muestra el gel con las fracciones; se analizaron los dos tratamientos (GT-PBP y RNA-HEL) junto con el vector vacío, sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre los carriles de condiciones inducidas contra sus controles.

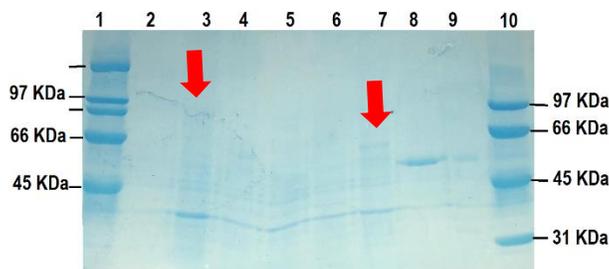


Figura 50 Gel de acrilamida al 10% con sobrenadantes libres de bacterias concentrados con TCA, carril 1) MPM alto; carril 2) SB de RNA-HEL no inducido; carril 3) SB de RNA-HEL inducido en la flecha roja se señala el sitio con el peso esperado de la RNA-HEL (94 KDa); carril 4) SB de vector vacío sin inducir; carril 5) SB de vector vacío inducido; carril 6) SB de dominio GT-PBP sin inducir; carril 7) SB dominio GT-PBP inducido, en la flecha se señala el sitio con el peso esperado de GT-PBP (54 KDa); carril 8) SB cepa *SeMor4.1*; carril 9) SB cepa *SeMor4.1*; carril 10) MPM bajo.

6. Discusión

Con respecto al Objetivo 1, se obtuvo la construcción pSK-HEL, cuyo gen conservó su propio promotor y quedó flanqueado con las enzimas EcoRI y SmaI, misma que fue necesaria para probar si tiene actividad toxica hacía larvas de *Phyllophaga*, y poder compararla con la construcción que contiene a GT-PBP intacto y solo (E9), y además con ambas proteínas en la misma construcción (F3).

Para la interpretación de los resultados de los biensayos nos hemos planteado la siguiente pregunta **¿Cómo ejerce *E. coli*, portadora de los genes de la RNA-HEL y GT-PBP de *SeMor4.1*, su función toxica?**

Hemos planteado las siguientes hipótesis basadas en la evidencia genética descrita por diferentes autores.

Hipótesis 1) La RNA-HEL participa en regulación de genes de virulencia (esto se ha demostrado en otras bacterias, Granato, 2016; Gough et al., 1992; Li y Wang, 2011; Salman-Dilgimen et al., 2011). En *E. coli* entonces podría incrementar la expresión de algunos de los genes de virulencia (de *E. coli*) y así generar toxicidad en insectos cuando se inyecta. Esta es una hipótesis de que actúa de manera indirecta.

Hipótesis 2: La RNA-HEL actúa como toxina. La proteína tiene una secuencia señal (1-37 pb) que envía a la proteína hacía el periplasma, y por lo tanto se puede empaquetar en vesículas de membrana, lo que le permitiría introducirse así en células eucarióticas. Finalmente podría alterar procesos asociados a RNA en la célula huésped y matarla. Esta es la hipótesis de que actúa de manera directa como toxina.

Hipótesis 3: La helicasa en el periplasma podría participar en cambios y procesamiento en moléculas de RNA presentes en el periplasma que podrían estar asociadas a toxicidad. Se demostró que las vesículas de membrana de *V. cholerae*; pueden realizar dicha actividad (Sjöström et al., 2015).

Hipótesis 4: El dominio GT-PBP se encuentra anclado en la membrana con su cara hacia el espacio periplásmico (Sauvage y Terrak, 2015) el cual puede ser exportado en vesículas de membrana, hacia la célula huésped y matarla. Esta es la hipótesis de que actúa de manera directa como toxina.

Hipótesis 5: La RNA-HEL incrementa la expresión de la GT-PBP y participa en la regulación de la misma (Granato, 2016; Gough et al., 1992; Li y Wang, 2011; Salman-Dilgimen et al., 2011), por lo tanto la RNA-HEL no tiene actividad en ausencia de GT-PBP, y esta última que podría actuar como toxina, tiene una disminución en su actividad.

Los resultados de bioensayos con las clonas portando los genes por separado en el vector pSK sugieren que ambas proteínas están asociadas a la toxicidad de manera individual ya que al día 7 del bioensayo la construcción pSK-Hel portadora del gen de la RNA-HEL tuvo un 100% de mortalidad (Figura 34), mientras que E9 tuvo una mortalidad al día 7 del bioensayo del 66.66% y un máximo de mortalidad del 100% al día 15 del bioensayo (Figura 33), por otro lado la construcción F3, portadora de ambos genes (RNA-HEL y GT-PBP) tuvo una mortalidad del 72.2% al día 7 del bioensayo y un 100% de mortalidad al día 10 del bioensayo (Figura 31). En el caso de que las concentraciones de proteínas fueran las mismas proporciones equimolares, estos resultados sugieren que la proteína más tóxica hacia larvas de *Phyllophaga* es la RNA-HEL que mató al 100% de las larvas en un menor tiempo comparado con los tratamientos de E9, F3 y el control negativo (H₂O). Estos resultados se confirman al realizar el análisis PROBIT que señala a la proteína helicasa como la más tóxica con una DL50 de 18.66 µg/larva, comparada con la Gly-PBP cuya DL50 fue de 24.375 µg/larva). No es posible comparar estos datos de toxicidad con otras toxinas reportadas en la literatura ya que no tenemos las proteínas puras. Sin embargo, comparando con otras construcciones portadoras de proteínas tóxicas provenientes de *SeMor4.1* recientemente reportadas por nuestro grupo en bioensayos similares, de sobrenadantes libres de bacterias, ambas proteínas parecen ser mucho menos tóxicas que la glutatión hidrolasa (Hgh) y la metiltransferasa (MtdSAM), las cuales están presentes en la construcción D2-O2, cuya DL50 fue de 0.65 µg/larva (Nava-Aparicio, 2019).

Los resultados de los bioensayos del laboratorio sugieren que se descarta la hipótesis 1) La RNA-HEL participa en regulación de genes de virulencia y participa en toxicidad de manera

indirecta (esto se ha demostrado en otras bacterias, Granato, 2016; Gough et al., 1992; Li y Wang, 2011; Salman-Dilgimen et al., 2011). En *E. coli* entonces, la presencia de la RNA-Hel podría incrementar la expresión de algunos de los genes de virulencia (de *E. coli*) y así generar toxicidad en insectos cuando se inyecta. En los resultados de los bioensayos (Fig. 7; Díaz-Sánchez 2012) se observó que cuando los genes RNA-HEL y GT-PBP se encuentran en el fragmento de 40 Kb tienen menor actividad que cuando se encuentran solos en la subclona de F3; se podría pensar que la RNA-HEL está regulando negativamente la expresión de GT-PBP ya que la actividad aumenta cuando se encuentran solas, sin embargo los resultados de Díaz-Sánchez en el 2012 con las mutantes $\Delta B1$ en donde la RNA-HEL quedó defectuosa y $\Delta E9$ que tiene únicamente al dominio GT-PBP, ambas mutantes presentaron actividad pero en ambos casos al día 2 del bioensayo tuvieron una disminución de aproximadamente 50% de mortalidad en comparación con F3 que tuvo un máximo de mortalidad del 100% al mismo día (Figura 8), lo que puede sugerir que la RNA-HEL al estar defectuosa o estar eliminada; no puede regular la expresión de GT-PBP esto se ve reflejado cuando las mutantes pierden actividad en ausencia de la RNA-HEL. Sin embargo, en todos los bioensayos mencionados se inyecta la misma cantidad de proteína total y no se sabe si las dos proteínas en cuestión, la Gly-PBP y la RNA-Hel están igualmente representadas. Se requiere obtener las proteínas puras y evaluar su actividad con concentraciones iguales, y además evaluar su DL50, o bien, realizar experimentos de expresión de la Gly-PBP en presencia y ausencia de la RNA-helicasa. De manera similar estos argumentos aplican también para descartar la Hipótesis 5 planteada: La RNA-HEL incrementa la expresión de la GT-PBP y participa en la regulación de la misma (Granato, 2016; Gough et al., 1992; Li y Wang, 2011; Salman-Dilgimen et al., 2011), por lo tanto, la RNA-HEL no tiene actividad en ausencia de GT-PBP, y GT-PBP tiene una disminución en su actividad. Esta es una hipótesis de que las proteínas podrían actuar en sinergismo. Ya que en los bioensayos realizados con las proteínas individuales la RNA-HEL es la proteína más tóxica, así como también el dominio GT-PBP presentó actividad, y la actividad tóxica de F3 portando ambos genes no es mayor, como se esperaría, si no que fue similar a E9. Por lo tanto, dichos resultados sugieren que cada proteína tiene actividad individual y que ninguna depende de la otra para tener actividad tóxica hacia las larvas de insectos.

Cabe destacar que los bioensayos que se realizaron con sobrenadantes libres de bacterias sugieren que las proteínas tóxicas son transportadas primero hacia el periplasma y después exportadas, posiblemente mediante vesículas de membrana. Esta sugerencia se basa en que los sobrenadantes presentaron actividad; y además los sobrenadantes hervidos perdieron dicha actividad lo que sugiere que la misma es de origen proteico; con estos resultados se descartó que la actividad tóxica de GT-PBP está asociada al peptidoglicano. Estos resultados mantienen abiertas las hipótesis 2, 3 y 4, que se refieren a que las proteínas tienen actividad individual y directa sin embargo, aún faltan estudios para poder asociar directamente la actividad hacia el mecanismo de acción de cada proteína sobre el hospedero.

Hipótesis 2: La RNA-HEL actúa como toxina. La proteína tiene una secuencia señal (1-37 aa) que envía a la proteína hacia el periplasma, y por lo tanto se puede empaquetar en vesículas de membrana, lo que le permitiría introducirse así en células eucarióticas. Finalmente podría alterar procesos asociados al RNA en la célula huésped y matarla, esto podría suceder debido a que las helicasas están involucradas en la degradación de RNA exógeno (Grant, et al., 2006; Schmidt, et al., 2012). Esta es la hipótesis de que actúa de manera directa como toxina.

Hipótesis 3: La helicasa en el periplasma podría participar en cambios y procesamiento en moléculas de RNA presentes en el periplasma que podrían estar asociados a toxicidad. Se demostró que las vesículas de membrana de *V. cholerae* pueden realizar dicha actividad (Sjöström et al., 2015).

Hipótesis 4: El dominio GT-PBP se encuentra anclado en la membrana con su cara hacia el espacio periplásmico (Sauvage y Terrak, 2015). En este compartimiento celular, la proteína podría ser exportada en vesículas de membrana, alterando o rompiendo la membrana del huésped ya que el dominio GT-PBP está involucrado en la unión de las cadenas de glicano, lo que podría explicar el alteramiento de moléculas de la membrana del huésped y matarla. Esta es la hipótesis de que actúa de manera directa como toxina.

En lo que respecta sobre los resultados de la DL50 en larvas de *P. blanchardi* (Figura 39), es importante resaltar que al compararlas con otras DL50 de toxinas Cry de Bt, las dosis obtenidas en nuestros ensayos son altas (F3 20. 159 µg/ larva, tratamiento E9 24.375 µg/larva y tratamiento RNA-HEL 18.661/larva µg), sin embargo, es importante mencionar que las dosis inyectadas son mezclas de proteínas que se encuentran en el sobrenadante por lo que

no es posible hacer una comparación directa con algunas toxinas Cry de Bt, que tienen como DL50 2 ng/larva en larvas de Lepidóptero (Pitre et al., 2008), ya que son dosis de proteínas puras. Tener un dato cuantitativo de la actividad de los sobrenadantes nos ayudará en un futuro para hacer una comparación con las proteínas purificadas individuales, donde esperamos una disminución considerable de la DL50 y así podremos comparar el potencial de las proteínas de *SeMor4.1* contra otras proteínas utilizadas actualmente en el control biológico.

Por otra parte, en ensayos realizados por Díaz-Sánchez, 2014, se observó que la clona F3 produjo 100% de mortalidad después de 2 días de iniciado el bioensayo (Fig. 8). Por lo contrario, en el presente trabajo se observa en la Figura 31 que F3 produjo al día 2 solamente cerca de 60% de Mortalidad, alcanzando el 100% de la misma al día 10. Estas diferencias podrían explicarse por la especie de insecto utilizado para los bioensayos, ya que Díaz-Sánchez (2014) usó *P. blanchardi* y en este trabajo se usaron larvas de *Phyllophaga* sp. Así, las diferentes especies podrían mostrar diferentes susceptibilidades a las diferentes proteínas tóxicas.

Con respecto al Objetivo 2 en relación con la expresión de las proteínas en un sistema heterólogo, y en particular al Sistema pQE (QIAGEN), se puede decir que la poca o nula producción de las proteínas clonadas y expresadas en el sistema de expresión se debe al bajo número de copias del plásmido y al promotor T5 que se considera débil. Dicho vector es eficiente para proteínas muy tóxicas, ya que es un sistema altamente reprimible (Joseph et al., 2015). Cabe destacar que a pesar de que el sistema pQE para la expresión de la RNA-HEL y el dominio GT-PBP no fue exitoso, la manipulación y conocimiento generado de este sistema ayudará en un futuro a la expresión de proteínas altamente tóxicas de *SeMor4.1*. Ya que al ser un sistema reprimible por la presencia de dos promotores LacO, evita la posible fuga de proteína recombinante, de este modo el crecimiento bacteriano no se ve afectado por la toxicidad de la proteína (Al-Hejin et al., 2019).

Con respecto al Sistema pET-22b(+), las construcciones pTZ-HEL y pTZ-SK-HEL permitieron continuar con el siguiente paso de la clonación de la RNA-HEL en el vector de expresión pET-22b(+). Sin embargo, se menciona que aún falta corroborar la secuencia del extremo 3', se enfatiza que el patrón de digestión con las enzimas NotI y XhoI fue correcta como se indica en la figura 41 (Gel de agarosa lado izquierdo).

La construcción de pET22-GT-PBP se ha secuenciado en el extremo 5' y se confirmó que la construcción coincide con la secuencia virtual esperada, y que la proteína se fusionó con el péptido señal pelB; es importante resaltar que aún falta secuenciar el extremo 3' de la construcción, se enfatiza que las digestiones con las enzimas HindIII y EcoRI concuerdan con lo esperado (Figura 42).

Los ensayos de expresión y purificación de la proteína señalan que se observa en mayor concentración una banda en el gel de acrilamida que coincide con el peso del dominio GT-PBP esperado (Figura 48), la purificación en BATCH de dicho dominio concuerdan con la misma banda con el peso esperado de 54 kDa sin embargo, es importante mencionar que en el vector vacío se observa una banda con el mismo peso estimado, por lo que es de suma importancia analizar las fracciones purificadas de la proteína por Western Blot, para confirmar con la ayuda del anticuerpo anti histidina en el C-terminal que es la proteína recombinante portadora del gen GT-PBP, además de los controles (vector vacío y construcción sin inducir). También se requiere continuar con la estandarización del sistema para determinar la solubilidad, actividad de la proteína, y hacer el escalamiento de los cultivos para obtener un mayor rendimiento de la proteína y de esta manera explotar la producción de la proteína recombinante y poder continuar con el siguiente paso de la caracterización de la proteína para probar la proteína pura en larvas de insectos.

7. Conclusión

Los resultados de bioensayos con las clonas portando los genes por separado en el vector pSK sugieren que ambas proteínas están asociadas a la toxicidad de manera individual, aunque no se sabe si la actividad está directa o indirectamente asociada con las proteínas en estudio.

Debido a los resultados negativos de la expresión de la RNA-HEL y el bajo rendimiento de la proteína PBP en el sistema pQE (QIAGEN), fue necesario buscar otro sistema de expresión que facilite la obtención de la proteína.

En este trabajo se han clonado y expresado los genes de la RNA-HEL y el dominio GT-PBP, en dos sistemas de expresión; primeramente en el sistema pQE de QIAGEN, para el dominio GT-PBP se obtuvo un bajo rendimiento de la proteína, y para la proteína RNA-HEL no se expresó la proteína, esto puede deberse a muchos factores, el principal es que dicho sistema tiene un promotor considerado débil y de bajo número de copias (Joseph et al., 2015), por lo

tanto es ineficiente para producir mayores rendimientos de proteína recombinante. Como segundo sistema de expresión se utilizó el sistema de vectores pET-22b(+) de Novagen, para el caso del dominio GT-PBP se ha clonado y expresado en dicho sistema, sin embargo se requiere corroborar por western blot para confirmar que la proteína purificada es el dominio GT-PBP.

Por otro lado, la proteína RNA-HEL ha sido clonada y se han realizado algunos ensayos para estandarizar la expresión. Sin embargo, se requiere realizar más ensayos de expresión y determinar las condiciones favorables para un mayor rendimiento de la proteína. Se requiere también corroborar la expresión por western blot.

Los experimentos que se realizaron en la expresión de las proteínas, en los cuales observamos poca o nula expresión de las mismas, sugieren también que las proteínas podrían ser tóxicas para la propia bacteria hospedera en la que se producen, por lo que es necesario buscar estrategias útiles para el mejoramiento de la expresión y así poder explotar el sistema de expresión para el estudio de otros genes de *SeMor4.1* asociados con actividad insecticida.

8. Perspectivas

Es importante realizar la caracterización de ambas proteínas puras y probar su potencial en la toxicidad hacia los insectos.

Estudiar las proteínas purificadas y el rol que tienen en la toxicidad en insectos, nos ayudará a comprender aspectos importantes sobre la patogenicidad de *SeMor4.1*, y así en un futuro desarrollar estrategias o productos bioinsecticidas para el control de plagas.

Por otra parte, existe potencial de aplicación en otras áreas de la biotecnología asociado al estudio de las proteínas en cuestión. Por ejemplo, debido a que las proteínas PBP son blanco de antibióticos, un estudio profundo del dominio GT-PBP podría ayudar al desarrollo de un nuevo antibiótico que tenga como sitio blanco el dominio glicosil-transferasa, ya que los antibióticos en su mayoría están dirigidos al dominio transpeptidasa (Sauvage y Terrak, 2015).

Con respecto a las RNA-HEL bacterianas, se ha demostrado que dichas proteínas constituyen objetivos prometedores como antivirales y terapias contra el cáncer (Steimer y Klostermeier, 2012), por lo que es de suma importancia la purificación de la proteína para investigar en un futuro si la proteína RNA-HEL de *SeMor4.1* tiene potencial como antiviral e incluso en terapias contra el cáncer.

9. Anexos

Anexo 1 Preparación de medios y soluciones

Elaboración de medio utilizado para crecimiento de bacterias

Medio LB

Pesar:	Sólido	Líquido
Triptona	10g	10g
Extracto de levadura	5g	5g
NaCl	5g	5g
Agar	15 g	

Disolver en agua destilada y aforar en 1 L

**Agregar el agar bacteriológico únicamente si se desea preparar medios sólidos. Agregar el polvo antes de aforar el volumen final.

Esterilizar en autoclave a 120 °C durante 20 minutos.

Anexo 2 Stock de Kanamicina

50 mg/ml en H₂O destilada.

Esterilizar por filtración y guardar en alícuotas de 1 ml, a -20 °C.

Anexo 3 Stock de Ampicilina

100 mg/ml en H₂O destilada

Esterilizar por filtración y guardar en alícuotas de 1 ml, a -20 °C.

Anexo 4 Stock de IPTG (1 M):

238 mg/ml en H₂O destilada.

Esterilizar por filtración y guardar en alícuotas de 1 ml, a -20 °C.

Anexo 5 Stock de X-gal

50 mg/ml

Esterilizar por filtración y guardar en alícuotas de 1 ml, a -20 °C.

Anexo 6 Preparación de cajas X-gal+IPTG

Adicionar	250 ml
X-gal 50 mg/ml	125 μ l
IPTG 100 mg/ml	62.5 μ l

Soluciones para preparación de ADN plasmídico

Anexo 7 Sol I

Glucosa 50 mM
Tris-HCl 25 mM pH 8
EDTA 10 mM

Aforar con agua destilada y ajustar a pH 8. Esterilizar en autoclave a 120 °C durante 20 min.

Anexo 8 Sol II

SDS 10%
NaOH 5 M
H ₂ O

Se preparó en fresco

Anexo 9 Sol III

NaOAc 3 M
Ajustar a pH 5.2

Anexo 10 LiCl 5 M

LiCl 5 M

Anexo 11 PEG

13% 8000/NaCl 1.6 M

Anexo 12 Preparación de gel de agarosa al 1%

Pesar:	
Agarosa	0.35 g

Disolver en el horno de microondas con 35 ml de TAE 1X, durante 30 s aprox.
Adicionar 2 μ l de Bromuro de etidio.

Anexo 13 Preparación de EDTA 0.5 M pH 8

Pesar:	100 ml
EDTA	18.61 g

NaOH	2 g
------	-----

Esterilizar por autoclave en vidrio
El EDTA se disuelve cuando este en pH 8.

Anexo 14 Preparación de stock de TAE 50X

Pesar:	100 ml
Tris base	24.2 g
Ácido acético	5.72 ml
EDTA 0.5 M	10 ml

Soluciones para preparación de células competentes por método CaCl₂

Anexo 15 Medio Ψ b

Pesar:	1 L
Bactoextracto de levadura	5 g
bacto-triptona	20 g
MgSO ₄	5 g

Disolver en 1 L de agua destilada, ajustar a pH 7 ajustado con KOH 1 M. Esterilizar a 120 °C, 20 min.

Anexo 16 Buffer Tfb1

Pesar:	250 ml
KAc 30 mM	0.736 g
KCl 100 mM	1.86 g
CaCl ₂ 10 mM	0.368 g
MnCl ₂ 50 mM	2.474 g
Glicerol al 15%	37.5 ml

Pesar y colocar en vaso de precipitado de 250 ml.

agregar 100 ml de H₂O miliQ o destilada y mezclar con agitador magnético.

Agregar el glicerol (en una probeta de 50 ml colocar los 37.5 ml de glicerol y aforar a 50 ml con H₂O, mezclar).

Ajustar a pH 5.8 con ácido acético .2 M (no ajustar con KOH), aforar y esterilizar por filtración en campana (primero con 0.45 μm, primero y luego con 0.22 μm).

Repartir en alícuotas en tubos falcón nuevo.

Anexo 17 Buffer Tfb2

Pesar:	100 ml
MOPS o PIPES 10 mM	0.21 g
CaCl ₂	1.103 g
KCl 10 mM	0.746 g

Glicerol al 15%	15 ml
-----------------	-------

Pesar y colocar en vaso de precipitado para 100 ml

Agregar 50 ml de H₂O miliQ o destilada y mezclar con agitador magnético hasta que se disuelva

Agregar el glicerol (en una probeta de 50 ml colocar los 15 ml de glicerol y aforar a 50 ml con H₂O, mezclar).

Ajustar a pH 6.5 con KOH

Aforar y esterilizar por filtración verter el glicerol en una probeta de 50 ml Ajustar a pH 6.8 con KOH, Esterilizar por filtración (primero con 0.45 µm, primero y luego con 0.22 µm).

Repartir en alícuotas en tubos falcón nuevos.

Soluciones para purificación de la proteína bajo condiciones desnaturalizantes

Anexo 18 Buffer B (Buffer de lisis),

Pesar:	1 L
NaH ₂ PO ₄ 100 mM (PM 137.99 g/mol)	13.8 g
Tris·Cl 10 mM (PM 121.1 g/mol)	1.2 g
Urea 8 M (PM 60.06 g/mol)	480.5 g

Ajustar a pH 8.0 usando NaOH.

Anexo 19 Buffer C (buffer de lavado)

Pesar:	1 L
NaH ₂ PO ₄ 100 mM (PM 137.99 g/mol)	13.8 g
Tris·Cl 10 mM (PM 121.1 g/mol)	1.2 g
Urea 8 M (PM 60.06 g/mol)	480.5 g

Ajustar a pH 6.3 usando HCl.

Buffers de elución

Anexo 21 Buffer D (buffer de elución)

Pesar:	1 L
NaH ₂ PO ₄ 100 mM (PM 137.99 g/mol)	13.8 g
Tris·Cl 10 mM (PM 121.1 g/mol)	1.2 g
Urea 8 M (PM 60.06 g/mol)	480.5 g

Ajustar pH 5.9 usando HCl.

Anexo 22 Buffer E (buffer de elución)

Pesar:	1 L
NaH ₂ PO ₄ 100 mM (PM 137.99 g/mol)	13.8 g
Tris·Cl 10 mM (PM 121.1 g/mol)	1.2 g

Urea 8 M (PM 60.06 g/mol)	480.5 g
---------------------------	---------

Ajustar pH 4.5 usando HCl.

Nota: Debido a la disociación de la urea, el pH de los buffers B, C, D, y E deben ser ajustados inmediatamente antes de su uso. No usar autoclave.

Anexo 22 Soluciones para purificación de la proteína bajo condiciones nativas

Anexo 23 Buffer de lisis

Pesar	1 L
NaH ₂ PO ₄ 50 mM (PM 137.99 g/mol)	6.90 g
NaCl 300 mM (PM 58.44 g/mol)	17.54 g
Imidazol 10 mM (PM 68.08 g/mol)	0.68 g

Ajustar a pH 8.0 usando NaOH.

Anexo 24 Buffer de lavado

Pesar	1 L
NaH ₂ PO ₄ 50 mM (PM 137.99 g/mol)	6.90 g
NaCl 300 mM (PM 58.44 g/mol)	17.54 g
Imidazol 20 mM (PM 68.08 g/mol)	1.36 g

Ajustar a pH 8 usando NaOH

Anexo 25 Buffer de elución

Pesar	1 L
NaH ₂ PO ₄ 50 mM (PM 137.99 g/mol)	6.90 g
NaCl 300 mM (PM 58.44 g/mol)	17.54 g
Imidazol 250 mM (PM 68.08 g/mol)	17 g

Ajustar a pH 8 usando NaOH

Soluciones para geles de acrilamida

Soluciones stock

Anexo 26 Solución 1 monómero (30% T 27% Bis)

Pesar	100 ml
Acrilamida /Bis	29.2 g

Aforar con H₂O miliQ o destilada

Usar guantes y cubrebocas

Guardar a 4 °C cubierto con aluminio en plástico.

Anexo 27 Solución 2 Buffer para Gel de resolución (1.5 M tris-Cl) pH 8.8

Pesar	100 ml
Tris	18.15 g

Ajustar a pH 8.8 con HCl y aforar con H₂O miliQ ó destilada.

Anexo 28 Solución 3 Buffer para Gel concentrador (0.5 M tris-Cl) pH 6.8

Pesar	100 ml
Tris base	6 g

Ajustar a pH 6.8 con HCl y aforar con H₂O miliQ ó destilada.

Anexo 29 Solución 4 SDS 10%

Pesar	100 ml
SDS	10 g

Usar guantes y cubrebocas

Anexo 30 Solución 5 Iniciador 10% persulfato de Amonio

Pesar	5 ml
Persulfato de amonio	0.5 g

Guardar a -20 °C con aluminio

Anexo 31 Solución 6 Over-lay (para cubrir el gel de resolución) (.375 M tris-Cl pH 8.8, .1% SDS)

Adicionar	100 ml
Tris (Sol. 2)	25 ml
SDS (Sol. 4)	1 ml

Aforar con H₂O miliQ o destilada.

Anexo 32 Solución 7 Buffer de muestra 2X (.125 M tris-Cl pH 6.8, 4% SDS, 20% glicerol, 10% 2-mercaptoetanol)

Adicionar	10 ml
Tris (Sol. 3)	2.5 ml
SDS (Sol. 4)	4 ml
Glicerol	2 ml
2-mercaptoetanol	1 ml

Adicionar una pizca de azul de bromo fenol

Aforar con H₂O miliQ

Guardar en alícuotas de 1 ml y congelar a -20 °C

Anexo 33 Solución 8 Buffer Tanke (Buffer de corrida 4X) (.025 M tris pH 8.3, 0.192 M, glicina 0.1X, SDS)

Adicionar	1 L
Tris	3 g
Glicina	14.4 g
SDS (Sol. 4)	10 ml

Aforar con H₂O miliQ

Anexo 34 Solución 9 Stock de tñido (1% Azul de comassie R-250)

Pesar	100 ml
Comassie Blue R-250	1 g

Aforar con H₂O miliQ

Anexo 35 Solución 10 para tñir (0.125 % azul de comassie R-250, 50% metanol, 10% ácido acético)

Adicionar	250 ml
Comassie Blue R-250 (Sol. 9)	31.25 ml
Metanol	125 ml
Ácido acético	25 ml

Aforar con H₂O miliQ

Anexo 36 Solución 11 para desteñir (50% metanol, 10% ácido acético)

Adicionar	250 ml
Metanol	125 ml
Ácido acético	25 ml

Aforar con H₂O miliQ

Anexo 37 Protocolo para preparación de gel de resolución

Contenido de la solución	Solución	1 mini gel 10%
H ₂ O	H ₂ O	1.9 ml
1.5 M Tris-Cl pH 8.8	Buffer 2	1.3 ml
Acrilamida 30%, bis 2.7%	30% T, 2.7% C Bis	1.7 ml
SDS 10%	10% SDS	50 µl
10% Persulfato de Amonio	Persulfato de Amonio	50 µl
	TEMED	5 µl

-Colocar la mezcla del gel de resolución entre los vidrios de la cámara inmediatamente después de agregar el TEMED; dejar sobrante de la mezcla en el frasco como un control para la polimerización. A continuación, colocar solución Over-lay (ver anexo 31) sobre el gel de

resolución (para obtener una superficie del gel completamente plana) y dejar polimerizar la mezcla durante 30 min.

Protocolo de preparación de gel concentrador

Contenido de la solución	Solución	1 mini gel 10%
H ₂ O	H ₂ O	1.13 ml
0.5 M Tris-Cl pH 6.8	Buffer 3	500 ml
Acrilamida 30%, bis 2.7%	30% T, 2.7% C Bis	330 µl
SDS 10%	10% SDS	20 µl
10% Persulfato de Amonio	Persulfato de Amonio	20 µl
	TEMED	2 µl

-Después de colocar en la mezcla del gel concentrador se colocan los peines y se deja polimerizar por 30 min.

-Teñido de Gel: Lavar el gel durante 10 min con H₂O destilada (repetir 3 veces). Adicionar 40 ml de solución para teñir (BioRad), e incubar durante 30 min en agitación suave (10 rpm). Se continua con el lavado, 3 veces con agua destilada, y se deja toda la noche con agua destilada para desteñir y al día siguiente ser observado.

Anexo 38 Buffer de muestra

0.225 M Tris-Cl; pH 6.8
50% Glicerol
2% SDS
0.05% azul de bromofenol
0.25 M DTT

9 Bibliografía

- Aguado-Santacruz**, G. A., Moreno-Gómez, B., Jiménez-Francisco, B., García-Moya, E. y Preciado-Ortiz, R. E. (2012). Impacto de los sideróforos microbianos y fitosidéforos en la asimilación de hierro por las plantas: una síntesis. *Revista fitotecnica mexicana*, 35 (1), 9-21.
- Altieri**, M.A., Trujillo, J., Campos, L., Klein-Koch, C., Gold, C.S. y Quezada, J. R. (1989). El control biológico clásico en América Latina en su contexto histórico. *Manejo Integrado de Plagas*, 12: 82-107.
- Amaral**, L., Schwarz U., and Lorian V. (1986). Penicillin-binding site on the *Escherichia coli* cell envelope. *Journal Bacteriol* 167:492-495.
- Badii**, M. H., & Abreu, J. L. (2006). Control biológico una forma sustentable de control de plagas. *International Journal of Good Conscience*, 1, 82–89.
- Bielza** P., y Contreras J. (2005). La resistencia a insecticidas en *Frankliniella occidentalis* (Pergande). *Phytoma España*. 173, 58-62.
- Bizzarri**, M. F., Prabhakar, A., Bishop, A. H. (2008). Multiple-locus sequence typing analysis of *Bacillus thuringiensis* recovered from the phylloplane of clover (*Trifolium hybridum*) in vegetative form. *Microbiol Ecol* 55:619–625
- Bonnington**, K.E. & Kuehn, M.J. (2014) Protein selection and export via outer membrane vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1843, 1612-1619.
- Bravo**, A., Gill, S., Soberón, M. (2007) Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicol* 49:423–435.
- Cabañas-Romero**, P. V y Huerta-Saquero, A. (2015). Nanomáquinas biológicas: los sistemas de secreción bacterianos. *Mundo Nano. Revista Interdisciplinaria en Nanociencia y Nanotecnología*, [S.l.], v. 7, n. 13.
- Cabrera**, C., Gómez, R., y Zúñiga, A. (2007). La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. *Colombia Médica*. 38 (2), 149-158.
- Cárdenas-Perea** M. E. (2014). Factores de virulencia bacteriana: la “inteligencia” de las bacterias. *Elementos* 94: 35-43.
- Cabañas**, P. V., & Huerta-saquero, A. (2003). Nanomáquinas biológicas: los sistemas de secreción bacterianos. *Mundo Nano*, 7, 28–36. 8.
- Cabañas**, P. V., & Huerta-saquero, A. (2016). Nanomáquinas biológicas: los sistemas de secreción bacterianos. *Mundo Nano*, 7, 28-36.
- Casadevall** A., and Pirofski L. (1999). Host-pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity infect. *Infection and Immunity*. 67:8 3703-3713.
- Castagnola**, A., & Stock, S. P. (2014). Common virulence factors and tissue targets of entomopathogenic bacteria for biological control of lepidopteran pests. *Insects*, 5, 139–166.
- Chattopadhyay**, P., Banerjee, G., & Mukherjee, S. (2017). Recent trends of modern bacterial insecticides for pest control practice in integrated crop management system. *3 Biotech*, 7, 1- 11.
- Chirinos**, D., and Geraud Pouey, F. (2011). El manejo de plagas agrícolas en Venezuela. Análisis y reflexiones sobre algunos casos. *Interciencia*, 36 (3), 192-199.
- Cordin**, O., Banroques, J., Tanner, N. K. & Linder, P. (2006). The DEAD-box protein family of RNA helicases. *Gene*. 367:17-37.
- Costa**, T. R., Felisberto-Rodrigues, C., Meir, A., Prevost, M. S., Redzej, A., Trokter, M., Waksman, G. (2015) Secretion systems in Gram-negative bacteria: Structural and mechanistic insights. *Rev. Microbiol*. 13,343–359.
- Costerton**, J. W. (1995). Overview of microbial biofilms. *Journal of Industrial Microbiology*, 15, 137–140.

- Cruz-López**, V. M. (2015) Evaluación de la clona E9, portadora del gene PBP de la cepa mexicana *Serratia entomophila* Mor 4.1 en larvas de Lepidóptero: *Spodoptera frugiperda* y *Galleria mellonella*. Tesis de licenciatura. FCB, UAEM.
- Dalvie**, M., Cairncross, E., Solomon, A., London, L. (2003). Contamination of rural surface and ground water by endosulfan in farming areas of the Western Cape, South Africa. *Environ. Health*. 2: 1-15.
- Del Rincon Castro**, M. C. e Ibarra J. E. (2005). Effect of a nucleopolyhedrovirus of *autographa californica* expressing the enhancin gene of *Trichoplusia ni* granulovirus on *T. ni* Larvae. *Biocontrol Science and Technology*. 15:701-710.
- Den Blaauwen**, T. De Pedro, M., Nguyen-Distèche & Ayala, J. (2008). Morphogenesis of rod-shaped sacculi. *FEMS Microbiol Rev* 32: 321–344.
- Demir**, I., Eryüzlü, E., and Demirbağ, Z. (2012). A study on the characterization and pathogenicity of bacteria from *Lymantria dispar* L. (Lepidoptera: Lymantriidae). *Turk J Biol.* (36) 459-468.
- Díaz-Sánchez**, M. (2014) Identificación de los genes de virulencia de la clona C8 originaria de la genoteca de *S. entomophila* Mor4.1, cepa patógena hacia larvas de Scarabaeidae (Coleóptera) de importancia agrícola. *Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos*.
- Drago**, M. E., Sainz, T. del R. (2006)). Sistemas de expresión para proteínas terapéuticas recombinantes. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 37
- Egan**, A., Maya-Martínez, R., Ayala, I., Bougault, C. M., Banzhaf, M., Breukink, E., Simorre, J. P. (2018). Induced conformational changes activate the peptidoglycan synthase PBP1B. *Molecular microbiology*, 110(3), 335–356.
- Ewing** B, S., Goldfinger, A., Oursler, A., Reed, D., Moore and Wackernagel, M. (2009) The Ecological Footprint Atlas 2009. Oakland: Global Footprint Network. 111 pp.
- FAO**. (2012). Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. <http://www.fao.org>
- FAO**. (2018). Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. <http://www.fao.org>
- Ferrer**, A. (2003). Intoxicación por plaguicidas, *Toxicol. Clín.* 26, 1–5.
- FIRA**. (2016) Programa Agroalimentario. Maíz 2016. Dirección de investigación y evaluación económica y sectorial.
- Flint**, M. L., and R. Van den Bosch. (1981). Introduction to integrated pest management. *Plenum Press, New York*. Pp. 311, 50.
- García**, K., Ibarra, J. E., Bravo, A., Díaz, J., Gutiérrez, D., Torres P. V., and Gómez de León, P. (2015). Variability of *Bacillus thuringiensis* Strains by Eric-Pcr and Biofilm Formation. *Current Microbiology*. 70(1): 10-8.
- Genin**, S., Gough, C. L., Zischek, C. and Boucher, C. A. (1992). Evidence that the hrpB gene encodes a positive regulator of pathogenicity genes from *Pseudomonas solanacearum*. *Mol Microbiol*. 6(20):3065-76.
- Gerlach**, R. G., Hensel, M. (2007) Protein secretion systems and adhesins: The molecular armory of Gram-negative pathogens. *Int. J. Med. Microbiol.*, 297, 401–415.
- Goffin**, R. C. y. Ghuysen, J.M. (1998). Multimodular penicillin binding proteins: and enigmatic family of othologs and paralogs. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 62:1079-1093.
- Gómez** Ing. Agr. M. (2000). Importancia del arbolado en el entorno urbano y rural. *Cátedra de Parques y Jardines Universidad Nacional de San Luis*.
- González** P. B., y Dreyfus G. (2003). Sistemas de secreción de proteínas en las bacterias gram negativas: Biogénesis flagelar y translocación de factores de virulencia. *Mensaje Bioquímico*. 27: 45–63.
- Ghuysen**, J. M. (1997). Penicillin-binding proteins. Wall peptidoglycan assembly and resistance to penicillin: facts, doubts and hopes. *The International Journal of Antimicrobial Agents*. 8:45-60

- González P. B., Dreyfus G. (2003).** Sistemas de secreción de proteínas en las bacterias gram negativas: Biogénesis flagelar y translocación de factores de virulencia. *Mensaje Bioquímico*. 27, 45–63.
- Gough, C. L., Genin. S., Zischek, C. and Boucher, C. (1992)** Hrp genes of *Pseudomonas sotanacearum* are homologous to pathogenicity determinants of animal pathogenic bacteria and are conserved among plant pathogenic bacteria, *Mol Plant-Microb Interact*. 5: in press.
- Gorbalenya, A. E. and Koonin, E. V. (1993).** Helicases: amino acid sequence comparisons and structure–function relationships. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 3, 419–429.
- Gorostieta-Nava. (2018).** Clonación, expresión y purificación de la proteína PBP de la cepa mexicana *Serratia entomophila* Mor 4.1, bacteria patógena hacia larvas del insecto *phyllophaga blanchardi*. Tesis de licenciatura. FCB, UAEM.
- Granados, G. (2001).** El Maíz en los trópicos. Mejoramiento y producción. Paliwal, R. L., Granados, G., Laffitte, H. R. y Violic, A. D. (Eds) Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Depósito de documentos de la FAO. *Departamento de Agricultura*.
- Granato, L. M., Picchi, S. C., Andrade, M. D., Takita, M. A., Souza, A. A., Wang, N., and Machado, M.A. (2016).** The ATP-dependent RNA helicase HrpB plays an important role in motility and biofilm formation in *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *BMC Microbiology*. 16, 1-14.
- Grant SR, Fisher EJ, Chang JH, Mole BM, Dangl JL: Subterfuge and manipulation: type III effector proteins of phytopathogenic bacteria. *Ann Rev Microbiol*. 2006, 60: 425-449.
- Hidalgo, E. (2001).** Uso de microorganismos para el control de *Phyllophaga* spp. *Revista Manejo integrado de Plagas*. CATIE. N° 60. Unidad de Fitoprotección.
- Höltje, J. V. (1998)** Growth of the stress-bearing and shapemaintaining murein sacculus of *Escherichia coli*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 62: 181–203.
- Hurts, M., Glare, T. and Jackson, T., A. (2004).** Cloning *Serratia entomophila* antifeeding genes-a putative defective prophage active against the grass grub *Costelytra zealandica*. *Journal of Bacteriology*. 186(15):5116-28.
- Ibarra J., E. (2017).** Las bacterias como agentes de control biológico. *En: memorias del XXVIII Curso de Control Biológico*. (8) 114-126.
- Ibarra, J. E. 2007.** Uso de Bacterias en el Control Biológico. Capítulo 10. En: Teoría y Aplicación del Control Biológico, L. A. Rodríguez-del-Bosque y H. C. Arredondo-Bernal (Eds.). *Prometeo Editores*. 144-159.
- Inglis, G. D., Lawrence, A. M. (2001).** Effects of *Serratia marcescens* on the F1 generation of laboratory-reared *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). *J Econ Entomol* 94:362–366
- Iost, I., y Dreyfus, M. (2006).** DEAD-box RNA helicases in *Escherichia coli*. *Nucleic acids research*, 34(15), 4189–4197.
- Kamble, K. J., Thakor, N. J., Sonawane, S. P., Sawant, A. A. (2016).** Review on need of utilization of biopesticides in agriculture for safe environment. In: 3rd International Conference on “Latest Concepts in Science, Technology and Management”. Maharashtra, India, pp 16–23
- King, D.T., Wasney, G.A., Nosella, M., Fong, A., and Strynadka, N.C.J. (2016)** *Escherichia coli* penicillin-binding protein 1B: Structural insights into inhibition. *J Biol Chem* 292: 979–993.
- Klein, M. G. (1988).** Pest management of soil-inhabiting insects with microorganisms. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 24:337–349.
- Li, J. and Wang, N. (2011).** Genome-wide mutagenesis of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* reveals novel genetic determinants and regulation mechanisms of biofilm formation. *PLoS One*.; 6:e21804.
- Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C., Krieger, M., Scott, M., Zipursky, S. L., Darnell, J. (2006).** Biología celular y molecular. Quinta edición. *Editorial médica Panamericana*.
- McBroom, A. J., & Kuehn, M. J. (2007).** Release of outer membrane vesicles by Gram-negative bacteria is a novel envelope stress response. *Molecular Microbiology*, 63, 545–558.
- McQuade, R., Stock, S. P. (2018).** Secretion Systems and Secreted Proteins in Gram-Negative Entomopathogenic Bacteria: Their Roles in Insect Virulence and Beyond. *Insects* 9, 68.

- Molina, J.** (2015). Factores de patogenicidad bacteriana. *Departamento de Microbiología y Parasitología*. UNAM.
- Morón, M.A.** (1994). Aspectos bioecológicos sobre Scarabaeidae (sensu lato) (Insecta: Coleóptera). In: *Memorias XXI Congreso de la Sociedad Colombiana de Entomología*: 151-158.
- Morón, M. A.** (1984). Escarabajos: 200 millones de años de evolución. *Instituto de Ecología*. A.C. México. Pp. 6-15, 25-54.
- Morón, M. A.** (1988). Las especies de *Phyllophaga* (Coleóptera Melolonthidae) con mayor importancia en México. *III Mesa Redonda sobre Plagas del Suelo, Morelia, Michoacán México. Sociedad Mexicana de Entomología. & ICI de México*. 81-102.
- Morón, M. A.** (1994). Fauna de Coleóptera Lamellicornia en las montañas del noreste de Hidalgo, México. *Acta Zool.* (n.s.) 63:7-59
- Nanninga, N.** (1998). Morphogenesis of *Escherichia coli*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 62:110-129.
- Nava-Pérez E.,** García-Gutiérrez C., Camacho-Báez J. R. y Vázquez-Montoya E. L. (2012). Bioplaguicidas: una opción para el control biológico de plagas. *Revista de Sociedad, Cultura y Desarrollo Sustentable*. pp 17-19
- Núñez-Valdez, M. E.,** Calderón, M. A., Aranda, E., Hernández, L., Ramírez-Gama, R. M., Lina, L., Villalobos, F. J. (2008). Identification of a putative Mexican strain of *Serratia entomophila* pathogenic against root-damaging larvae of Scarabaeidae (Coleóptera). *Applied and Environmental Microbiology*, 74(3), 802–810.
- Núñez-Valdez, M. E.,** and Mahanty H. K. (1996). The amb2 locus from *Serratia entomophila* confers anti-feeding effect on larvae of *Costelytra zealandica* (Coleopteran: Scarabaeidae). *Gen* 172:75–79.
- Núñez-Valdez, M. E.,** Rodríguez-Segura Z., Gómez Poupard A., Romero-López A. A., Villalobos-Hernández, F. J. (2004). La agrobiotecnología como una estrategia promisorio para el manejo sustentable de la gallina ciega (Coleóptera: Scarabaeidae). *Investigación Agropecuaria*. Vol. 2. 2004.
- Núñez-Valdez, M. E.,** Romero-López A. A., Arzuffi-Barreda R., Aldana-Llanos L., Valdés-Estrada M. E., Figueroa-Brito R., and Villalobos F. J. (2002). Agrobiotecnología aplicada al manejo integrado de plagas subterráneas: un enfoque promisorio para el manejo de la gallina ciega (Coleóptera: Scarabaeidae) y el picudo negro del nardo y agave (Coleóptera: Curculionidae), p. 139–157. In G. A. Aragón, J. F. López-Olguín, and C. M. Tornero (ed.), *Métodos para la generación de tecnología agrícola de punta. Publicación especial de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México*. p. 74-80.
- Pink, D.,** Moeller, J., Quinn, B., Jericho M., and Beveridge T. (2000). On the architecture of the Gram-negative bacterial murein sacculus. *Journal Bacteriol.* 182:5925-5930.
- Plenge-Tellechea, F.,** y Sierra-Fonseca, J. (2007). Riesgos a la salud humana causados por plaguicidas. *Tecnociencia Chihuahua* 1, 4-6.
- Plenge, L.,** Vargas, J. (2003). Efecto tóxico de los plaguicidas agrícolas sobre la relajación muscular. Estudio de la Ca²⁺-ATPasa de retículo sarcoplásmico (SERCA). *Ciencia en la Frontera*. 2: 75-79
- Porcar, M.,** Gómez, F., Gruppe, A., Gómez-Pajuelo, A., Segura, I., Schroder, R. (2008). Hymenopteran specificity of *Bacillus thuringiensis* strain PS86Q. *Biol Control* 45:427–432
- Ramachandran, V.,** Chandrakala, B., Kumar, V. P., Usha, V., Solapure S. M., and De Sousa S. M. (2006). Screen for inhibitors of the coupled transglycosylase of peptidoglycan biosynthesis in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 50:1425-1432.
- Oerke E. C.,** Dehne H. W. (2004). Safeguarding production-losses in major crops and the role of crop protection. *Crop Protection*. 23: 275-285.
- O’Callaghan, M.,** and Gerard, E. M. (2005). Establishment of *Serratia entomophila* in soil from a granular formulation. *NZ Plant Prot* 58:122–125.
- Oerke, E. C.,** and Dehne, H. W., (2004). Safeguarding Production - Losses in Major Crops and the Role of Crop Protection. *Crop Protection* 23: 275.

- OMS**, (2011). Organización Mundial de la Salud. <http://www.who.int/es/>
- Oliveira**, C. M., Auad, A. M., Mendes, S. M., Frizzas, M. R. (2014) Crop losses and the economic impact of insect pests on Brazilian agriculture. *Crop Prot* 56:50–54.
- Pitre**, L., Hernández, J., Bernal, J. (2008). Toxicidad de δ -endotoxinas recombinantes de *Bacillus thuringiensis* sobre larvas de la polilla guatemalteca (*Tecia solanivora*) (Lepidoptera: *Gelechiidae*). *Rev. colomb. biotecnol*, 10, 85-96.
- Ramírez-Salinas**, C., y Castro-Ramírez, A. E. (2000). El complejo "gallina ciega" (Coleoptera: Melolonthidae) en el cultivo de maíz, en El Madronal, municipio de Amatenango del Valle, Chiapas, México. *Acta zoológica mexicana*. (79), 17-41.
- Ramírez-Salinas**, C. Morón, M. A., Castro-Ramírez, C. (2004). Descripción de los estados inmaduros de tres especies de Anómala, Ancognatha y Ligyrus (Coleoptera: Melolonthidae: Rutelinae y Dynastinae) con observaciones de su biología. *Acta Zool Mex (ns)* 20: 67-82.
- Rodríguez del Bosque**, L.A. (1991). Teoría y bases ecológicas del control biológico, pp. 6-19, In: L.A. Rodríguez del Bosque y R. Alatorre (eds). *Memorias del II Curso de Control Biológico*, SMCB-UAAAN, Buenavista, Saltillo; Coah, México. 7-9 octubre, 1991.
- Rodríguez-Segura**, Z. (2006). Determinantes Patogénicos de *Serratia entomophila* Mor4.1, Cepa activa Hacia Larvas de Scarabaeidae (Coleoptera) de Importancia Agrícola. Tesis de Maestría, *Centro de Investigación en Biotecnología, Universidad Autónoma del Estado de Morelos. México.*
- Rodríguez-Segura** Z., Chen. Villalobos F. J., Gill S., Núñez-Valdez M. E. (2012). The lipopolysaccharide biosynthesis core of the Mexican pathogenic strain *Serratia entomophila* is associated with toxicity to larvae of *Phyllophaga blanchardi*. *Journal of Invertebrate Pathology*. Volume 110, 24-32.
- Ruiz**, E., Ruiz, A., Guzman, S. y Pérez, L. (2011). Manejo y control de plagas del cultivo de tomate en Cintalapa, Chiapas, México. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 27(2), 129-137.
- Sadras**, V. O., and Denison, R. F. (2009) Do plant parts compete for resources? An evolutionary perspective. *New Phytol*. 183, pp. 565-574.
- Saïda**, F., Uzan, M., Odaert, B., & Bontems, F. (2006). Expression of highly toxic genes in E. coli: special strategies and genetic tools. *Current protein & peptide science*, 7(1), 47–56.
- Salazar-Marroquín**, E.L., L.J. Galan-Wong, V.R. Moreno-Medina, M.A. Reyes-Lopez and B. Pereyra-Alferez. (2016). Bacteriocins synthesized by *Bacillus thuringiensis*: Generalities and Potential Applications. *Reviews in Medical Microbiology*. 27(3): 95-101.
- Sambrook**, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning. A Laboratory Manual*. 2nd Ed. Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sarandón**, S. J. y Sarandón, R. (1993). Un enfoque ecológico para una agricultura sustentable En: Goin J and C Goñi (editores). *Elementos de Política Ambiental*. H Cámara de Diputados de la Pcia. Buenos Aires, Cap 19: 279-286.
- Sauvage**, E., & Terrak, M. (2016). Glycosyltransferases and Transpeptidases/Penicillin-Binding Proteins: Valuable Targets for New Antibacterials. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 5(1), 12.
- Sayyed**, R. Z., Patel, P. R. (2011). Biocontrol potential of siderophore producing heavy metal resistant *Alcaligenes sp.* and *Pseudomonas aeruginosa* RZS3 vis-a-vis organophosphorus fungicide. *Ind J. Microbiol* 51:266–272.
- Schiffer**, G. and Hóltje, J. V. (1999). Cloning and characterization of PBP1C, a third member of the multimodular class a penicillin-binding proteins of *Escherichia coli*. *Journal Biology Chemistry*. 274:32031-32039.
- Sivilla**. (2001). Prioridades del Sector Agropecuario y Forestal para la Formulación de Proyectos Integrales. COMPILACIÓN. Sistema de Investigación Francisco Villa. SEP. *CONACYT*. 157 p.
- Schmidt**, M.A., Balsanelli, E., Faoro, H. et al. The type III secretion system is necessary for the development of a pathogenic and endophytic interaction between *Herbaspirillum rubrisubalbicans* and Poaceae. *BMC Microbiol* 12, 98 (2012).
- Spratt**, B. G., Zhou, J., Taylor, M., Merrick M., J. (1996). Monofunctional biosynthetic peptidoglycan transglycosylases. *Molecular Microbiology*. 19:639-640.

- Steimer, L., & Klostermeier, D.** (2012). RNA helicases in infection and disease. *RNA biology*, 9(6), 751–771.
- Sung, M.T., Lai, Y.T., Huang, C.Y., Chou, L.Y., Shih, H.W., Cheng, W.C.; Wong, C.H., Ma, C.** (2009) Crystal structure of the membrane-bound bifunctional transglycosylase PBP1b from *Escherichia coli*. USA. Proc. Natl. Acad. Sci.
- Thacker, Jonathan, R. M.** (2002). An introduction to arthropod pest control. Cambridge University Press, Cambridge
- Vakulskas, C. A., Pannuri A., Cortes-Selva D., Zere T. R., Ahmer B. M., Babitzke P, Romeo T.** (2014). Global effects of the DEAD-box RNA helicase DeaD (CsdA) on gene expression over a broad range of temperatures. *Mol. Microbiol* 92:945–958.
- Vimaia Devi, P. S., Ranga Rao, G. V., Gopalakrishnan, S., Sivakumar, G.** (2012). Environmental impact of microbial pesticides. In: Dhillon MK, Sehrawat KL (eds) Sharma HC. Environmental Safety of Biotech and Conventional IPM Technologies, Studium Press LLC, Houston, pp 261–272.
- Villalobos, F. J., Romero-Lopez, A. Y Núñez-Valdez, M. E.** (2001). Diagnóstico del Problema Causado por Gallina Ciega en Cultivos de Maíz del Estado de Morelos. *En: Memorias Ier Simposium de Manejo Integrado de Plagas del Estado de Morelos*. UAEM. Morelos, México.
- Young, K. D.** (2001). Approaching the physiological functions of penicillin-binding proteins in *Escherichia coli*. *Biochimie*. 83:99-102.
- Walker, J. E., Saraste, M., Runswick, M. J. and Gay, N. J.** (1982). Distantly related sequences in the α - and β -subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J*. 1, 945–951.
- Zapun, A., Contreras-Martel, C. Vernet, T.** (2008) Penicillin-binding proteins and β -lactam resistance. *FEMS Microbiol Rev* 32: 361–385.
- Zhou, L., Srisatjaluk, R., Justus, D. E., & Doyle, R. J.** (1998). On the origin of membrane vesicles in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 163, 223–228.