



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Caracterización funcional de la enzima OtsB2 de *Pseudarthrobacter chlorophenolicus* Mor30. 16

**TESIS PROFESIONAL POR ETAPAS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
B I Ó L O G O
P R E S E N T A:
FERNANDO ARANDA LOZANO**

CODIRECTORES

DR. JOSÉ AUGUSTO RAMÍREZ TRUJILLO

DR. RAMÓN SUÁREZ RODRÍGUEZ

CUERNAVACA, MORELOS

SEPTIEMBRE, 2020



El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Fisiología Molecular de Plantas del Centro de Investigación en Biotecnología de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, bajo la dirección del Dr. José Augusto Ramírez Trujillo y el Dr. Ramón Suárez Rodríguez.

AGRADECIMIENTOS

Con mucho afecto y respeto a mis asesores: al Dr. José Augusto Ramírez Trujillo por su paciencia, dedicación y apoyo que recibí desde el día que ingresé al laboratorio; al Dr. Ramón Suárez Rodríguez por su ayuda, sus consejos, la confianza en mí depositada y por permitirme estar en su equipo de trabajo en el Laboratorio de Fisiología Molecular de Plantas.

A los miembros del sínodo: a la Dra. María del Rayo Sánchez Carbente, Dra. María Luisa Castrejón Godínez, Dr. José Augusto Ramírez Trujillo, Dr. Alexis Joavany Rodríguez Solís y al Dr. Edgar Dantán González por la disposición y apoyo en el desarrollo del proyecto.

A la M. en C. Nancy Hernández Bueno por la ayuda y consejos brindados en diversas estrategias experimentales empleadas en el presente trabajo.

Al M. en C. Prisciluis Caheri Salas Navarrete por el asesoramiento en la manipulación genética de levaduras.

Agradecimiento especial al M. en C. Abraham Omar Rivera Ramírez por el apoyo en la expresión heteróloga de la proteína, así como en el proceso de modelado computacional de esta molécula.

Al Dr. Edgar Dantán González por el apoyo material y equipamiento prestado del Laboratorio de Estudios Ecogenómicos.

A mis compañeros del Laboratorio de Fisiología Molecular de Plantas: Guadalupe Castillo, Laura Déctor, Claudia Puentes, Julio Salinas y Nicolás Elizalde, por las experiencias, el apoyo y por amenizar mi estancia en el laboratorio.

Al Centro de Investigación en Biotecnología (CeIB) y a las personas que hacen posible su funcionamiento en todos los ámbitos.

A la Facultad de Ciencias Biológicas, especialmente a los docentes.

DEDICATORIAS

A mis padres Martha Angélica Lozano Morales y César Gabriel Aranda Flores por todo el amor incondicional, apoyo, dedicación, paciencia y sobre todo sus enseñanzas; sin ustedes nada de esto sería posible. Mi logro también es suyo, los amo.

A mi hermano Diego Aranda Lozano, con quien he vivido gratos momentos; me enorgulleces, serás un gran científico.

A mi abuelo Antonio Aranda Valdés, quien siempre me ha apoyado en todo desde que era un niño. Has sido parte fundamental de todo esto.

A los hermanos que la vida me dio: Ruth Sotelo y Pablo Ortiz. Gracias por todos los buenos momentos, los quiero.

A mis amigos de la facultad, particularmente a mis carnales Javier y Daniel, la universidad no hubiera sido igual sin ustedes. Gracias por las risas, confianzas y el apoyo; realmente los aprecio.

Al resto de mis amigos de la carrera, Clara, Dania, Roxana, Crisset, Katia y Alberto, gracias por los buenos momentos.

A mis dos grandes amigos de la preparatoria, Pancho y Héctor, quienes también agradezco haber conocido y he aprendido bastante.

A mi gran amigo Joaquín Escutia, gracias por todo. A pesar de las circunstancias, parece que el tiempo no pasa por nosotros, siempre recordaré nuestras historias de la infancia.

A Vivian Angeles, gracias por tu amor, por el apoyo, tus atenciones y, sobre todo, por inspirarme a ser cada día mejor, te quiero; soy muy afortunado por haberte conocido.

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. MARCO TEÓRICO.....	2
2.1. Estrés ambiental en plantas	2
2.1.1. Tipos de estrés	2
2.2. Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (BPCV).....	3
2.3. Género <i>Arthrobacter</i>	3
2.3.1. <i>Pseudarthrobacter chlorophenolicus</i>	5
2.4. Solutos compatibles.....	5
2.4.1. Polioles	6
2.4.2. Betaínas	7
2.4.3. Aminoácidos osmoprotectores	7
2.4.4. Azúcares	8
2.5. Trehalosa	9
2.5.1. Organismos que sintetizan trehalosa	11
2.5.2. Rutas de biosíntesis y degradación.....	11
2.5.3. Vía OtsA/OtsB.....	13
2.5.3.1. TPS/TPP en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	14
2.5.3.2. Enzima OtsB.....	16
2.6. Glicosil hidrolasas	17
2.6.1. Familia 15 de las glicosil hidrolasas.....	18
3. ANTECEDENTES	20
3.1. OtsA/B bifuncional de <i>Cytophaga hutchinsonii</i>	20
3.2. OtsB2 de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	20
3.3. OtsB2 de <i>Pseudarthrobacter chlorophenolicus</i> Mor30.16	21

4. JUSTIFICACIÓN.....	23
5. HIPÓTESIS.....	23
6. OBJETIVOS	23
6.1. Objetivo general	23
6.2. Objetivos particulares	23
7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	24
8. MATERIALES Y MÉTODOS	25
8.1. Material biológico	25
8.1.1. Cepas bacterianas y fúngicas.....	25
8.1.2. Plásmidos.....	25
8.2. Medios de cultivo	27
8.3. Alineamientos de secuencias peptídicas de OtsB2.....	28
8.4. Análisis del dominio glicosil hidrolasa 15 de OtsB2	28
8.5. Construcción de mutantes $\Delta TPS2$ en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	29
8.5.1. Preparación de células competentes	29
8.5.2. Diseño de oligonucleótidos	29
8.5.3. Amplificación del marcador <i>LEU2</i>	30
8.5.4. Transformación en <i>S. cerevisiae</i> y delección de <i>TPS2</i>	31
8.5.5. Selección de las mutantes de levadura	32
8.6. Confirmación de levaduras mutantes	32
8.6.1. Evaluación fenotípica de <i>S. cerevisiae</i> $\Delta TPS2$	32
8.6.2. Corroboración de mutantes por PCR.....	33
8.7. Expresión de <i>otsB2</i> en <i>S. cerevisiae</i> $\Delta TPS2$	34
8.7.1. Transformación de <i>S. cerevisiae</i> $\Delta TPS2$ con construcciones.....	34
8.7.2. Verificación de las construcciones por PCR	35

8.7.3. Ensayo de complementación	36
8.8. Expresión de <i>otsB2</i> en <i>E. coli</i>	36
9. RESULTADOS	37
9.1. Obtención de levaduras mutantes $\Delta TPS2$	37
9.2. Confirmación de levaduras mutantes	38
9.3. Análisis de plásmidos	40
9.4. Transformación de <i>S. cerevisiae</i> $\Delta TPS2$ con vectores de complementación	41
9.5. Ensayos de complementación en <i>S. cerevisiae</i> $\Delta TPS2$	43
9.6. Alineamiento de secuencias de OtsB.....	44
9.7. Análisis del dominio GH15 de OtsB2	46
9.7.1. Alineamiento de OtsB2 y miembros de GH15	48
9.7.2. Alineamiento de OtsB2 y trehalasas.....	50
9.8. Digestión del vector pET28a- <i>otsB2</i>	51
9.9. Expresión de <i>otsB2</i> en <i>E. coli</i>	52
9.9.1. Expresión de <i>otsB2</i> en <i>E. coli</i> BL21(DE3).....	52
9.9.2. Expresión de <i>otsB2</i> en <i>E. coli</i> SHuffle	56
10. DISCUSIÓN	57
11. CONCLUSIONES	62
12. PERSPECTIVAS.....	62
13. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
14. ANEXOS	68

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Arthrobacter</i> sp.	4
Figura 2. Molécula de trehalosa	9
Figura 3. Acción de la trehalosa en proteínas.....	10
Figura 4. Interacción de la trehalosa con membranas celulares	10
Figura 5. Rutas de biosíntesis de trehalosa.....	13
Figura 6. Vía OtsA/OtsB	14
Figura 7. Complejo enzimático TPS/TPP de <i>S. cerevisiae</i>	15
Figura 8. Enzima OtsB (trehalosa-fosfato fosfatasa)	17
Figura 9. Segundo paso de la vía TPS/TPP.....	17
Figura 10. Barril (α/α) ₆	19
Figura 11. Análisis de dominios de OtsB1 con el programa InterPro.....	21
Figura 12. Análisis de dominios de OtsB2 con InterPro	22
Figura 13. Representación de la enzima putativa OtsB2.....	22
Figura 14. Metodología empleada.	24
Figura 15. Vector pSAL4	26
Figura 16. Vector de expresión pET28a(+).	26
Figura 17. Plásmido pDEST32.....	27
Figura 18. Oligonucleótidos y amplificación del marcador molecular	30
Figura 19. Deleción de <i>TPS2</i> por recombinación homóloga.....	32
Figura 20. Amplificación y digestión de <i>LEU2</i>	37
Figura 21. Ensayo de termosensibilidad.....	38
Figura 22. Confirmación de mutantes $\Delta TPS2$ por PCR	39
Figura 23. Repetición de la evaluación del fenotipo termosensible	39
Figura 24. Construcciones para ensayo de complementación.....	40
Figura 25. Digestión de construcciones con enzimas de restricción	41
Figura 26. Amplificación de construcciones presentes en el DNA genómico <i>S. cerevisiae</i>	42
Figura 27. Digestión de plásmidos aislados de <i>E. coli</i>	42
Figura 28. PCR de levaduras mutantes con plásmido.	43
Figura 29. Ensayo de complementación a 39°C.....	44
Figura 30. Alineamientos de OtsB (<i>motifs</i> I y II).....	45

Figura 31. Alineamientos de secuencias OtsB (motivo III)	46
Figura 32. Motivo I de las GH15 y OtsB2	48
Figura 33. <i>Motifs</i> II y III GH15 y OtsB2.....	49
Figura 34. Motivos IV y V GH15 y OtsB2	49
Figura 35. Motivos I, II y III OtsB2 y TreH.....	50
Figura 36. <i>Motifs</i> IV y V OtsB2 y TreH.....	51
Figura 37. Construcción pET28a- <i>otsB2</i>	51
Figura 38. Digestión pET28a- <i>otsB2</i>	52
Figura 39. Expresión de <i>otsB2</i> en <i>E. coli</i> BL21(DE3)	53
Figura 40. Ubicación de la proteína en fracción acuosa e insoluble	53
Figura 41. Diferentes condiciones de expresión de OtsB2 en <i>E. coli</i> BL21(DE3)	55
Figura 42. Condiciones 4, 5 y 6 con respecto a la tabla 9	55
Figura 43. Expresión de <i>otsB2</i> en <i>E. coli</i> SHuffle.....	56
Figura 44. BLAST de OtsB2.....	70
Figura 45. Dominios catalíticos putativos de la enzima OtsB de <i>S. espanaensis</i>	71
Figura 46. Disposición de OtsB bifuncional en el genoma de <i>S. espanaensis</i>	71
Figura 45. <i>Motifs</i> de las trehalosa-fosfato fosfatasas (OtsB2 y OtsB <i>S. espanaensis</i>)	72
Figura 46. Motivos de trehalasas en OtsB de <i>S. espanaensis</i>	72

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Diferencias entre miembros de GH15.	18
Tabla 2. Motivos que forman el sitio activo en GH15	19
Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para amplificar el marcador <i>LEU2</i>	29
Tabla 4. Oligonucleótidos diseñados para la verificación de mutantes.....	34
Tabla 5. <i>Primers</i> para amplificar <i>otsB2</i> y <i>otsB2</i> Δ GH15	35
Tabla 6. Cebadores para la amplificación de <i>TPS/TPP</i>	35
Tabla 7. BLAST de OtsB2	47
Tabla 8. Porcentajes de identidad de los miembros de GH15 y OtsB2.....	47
Tabla 9. Condiciones utilizadas para la expresión de OtsB2 en <i>E. coli</i>	54

ABREVIATURAS

°C: Grados Celsius	mM: Milimolar
aa: Aminoácido	mol: Moles
ADN/DNA: Ácido desoxirribonucleico	ng: Nanogramos
AMPc: Adenosín monofosfato cíclico	nm: Nanómetros
ARNm: ARN mensajero	pb: Pares de bases
ATP: Adenosín trifosfato	PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
BPCV: Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal	Pi: Fosfato inorgánico
EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético	PKA: Proteína quinasa A
g: Gramos	pmol: Picomoles
GA: Glucoamilasa	rpm: Revoluciones por minuto
GDE: Glucodextranasa	ssDNA: ADN de cadena sencilla
GH15: Glicosil hidrolasa familia 15	t6p: Trehalosa-6-fosfato
h: Horas	TE: Tris-EDTA
IPTG: Isopropil- β -D-1- tiogalactopiranosido	TPP: Trehalosa-fosfato fosfatasa
J: Joules	TPS: Trehalosa-fosfato sintasa
kDa: Kilodaltons	TreH: Trehalasa
kJ: Kilojoules	U: Unidades
Leu: Leucina	UDP: Uridina difosfato
M: Molar	Ura: Uracilo
mg: Miligramo	WT: <i>Wild type</i> / cepa silvestre
ml: Mililitro	μ g: Microgramos
	μ l: Microlitro
	μ M: Micromolar

1. RESUMEN

A partir de la rizosfera de plantas de frijol, en el Laboratorio de Fisiología Molecular de Plantas-CeIB/UAEM se aisló una cepa denominada *Pseudarthrobacter chlorophenicus* Mor30.16 que acumula trehalosa de manera natural; la secuenciación de su genoma reveló que esta bacteria posee tres rutas de biosíntesis de trehalosa. La primera, codificada por los genes *otsA* y *otsB* que involucra la formación de trehalosa-6-fosfato por medio de la enzima trehalosa-6-fosfato sintasa (OtsA), partiendo de UDP-glucosa y glucosa-6-fosfato, posteriormente, se convierte en trehalosa sufriendo una desfosforilación por la trehalosa-6-fosfato fosfatasa (OtsB). La segunda vía, codificada en los genes *treY* y *treZ* utilizan maltodextrinas como sustrato; la última ruta, transforma maltosa en trehalosa por la enzima trehalosa sintasa, codificada en *treS*.

Sin embargo, se identificaron dos secuencias correspondientes a *otsB* en el genoma de esta bacteria, una de ellas más grande a los genes reportados previamente y un análisis de dominios mostró que esta enzima putativa presenta dos dominios catalíticos, uno perteneciente a la trehalosa-fosfato fosfatasa en el N-terminal y otro que concierne a una glicosil hidrolasa de la familia 15 (GH15) en el C-terminal. Es por ello por lo que en el presente trabajo se propuso la caracterización funcional de esta enzima OtsB2 putativa.

De acuerdo con los resultados obtenidos, la expresión de *otsB2* no complementa a levaduras mutantes $\Delta TPS2$ (homólogo de *otsB*); asimismo, mediante el alineamiento de secuencias aminoacídicas de trehalosa-fosfato fosfatasas se reveló que OtsB2 carece de los residuos de ácido aspártico en el motivo I, los cuales son relevantes para llevar a cabo la actividad fosfatasa. Por otro lado, el dominio GH15 de OtsB2 muestra un porcentaje de identidad de 31.56% con enzimas trehalasas, además de presentar residuos altamente conservados en las regiones que, se ha reportado, forman el sitio activo en estas enzimas, sugiriendo que el dominio GH15 de OtsB2 puede corresponder a una trehalasa. Asimismo, OtsB2 fue expresada en *E. coli* BL21 (DE3) y la cepa SHuffle, observándose una banda de 94.02 kDa en SDS-PAGE; sin embargo, esta proteína se expresa de manera insoluble, formando cuerpos de inclusión. A pesar de esto, se pueden emplear diversas estrategias experimentales para purificar a OtsB2, realizar el ensayo enzimático de actividad trehalasa y determinar parámetros cinéticos para dicha actividad catalítica.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Estrés ambiental en plantas

El estrés ambiental, según Schulte (2014) es cualquier factor del entorno potencialmente desfavorable para los organismos vivos. Los agentes causantes del estrés ambiental generan condiciones que ocasionan cambios en todos los niveles funcionales de los seres vivos. Sin embargo, organismos como bacterias y plantas exhiben variedad de respuestas genéticas o moleculares para afrontar el entorno donde habitan, bajo cierto nivel de estrés (Bartels y Sunkar, 2005).

2.1.1. Tipos de estrés

El estrés ambiental se puede dividir a su vez en biótico y abiótico; el estrés biótico es causado por organismos vivos: animales, plantas, microorganismos e incluso se consideran también los virus. Por otro lado, el estrés abiótico incluye factores del medio, tales como la disponibilidad de nutrientes, déficit o exceso de agua, hipersalinidad, temperaturas extremas (frío o calor) y radiación UV.

En plantas, la sequía es el principal factor de estrés abiótico, ya que la turgencia de las células vegetales se ve alterada, modificando rasgos tanto morfológicos como fisiológicos. El estrés por falta de agua lleva como consecuencia el decremento de la difusión de nutrientes a través del sistema vascular, facilita la acumulación de radicales libres, produce deterioro de las membranas celulares, degradación de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (Vurukonda *et al.*, 2016). Por otro lado, las comunidades microbianas por debajo del nivel del suelo ayudan a mitigar los efectos negativos del estrés abiótico en poblaciones vegetales y estudios recientes han demostrado que algunos microorganismos pueden favorecer la tolerancia de las plantas ante escenarios de estrés abiótico por sequía.

2.2. Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (BPCV)

La rizosfera es el ambiente que está bajo la influencia de las raíces de las plantas, donde existe un flujo de compuestos orgánicos producto de la fotosíntesis que son exudados por la raíz (Barea y Azcón-Aguilar, 1982). El crecimiento y desarrollo del sistema radical afecta significativamente a las poblaciones bacterianas del suelo, debido a la disponibilidad de una fuente de carbono derivada de compuestos orgánicos liberados por la raíz (Bowen y Rovira, 1999). Estudios de Loredó y colaboradores (2004) han demostrado que algunas bacterias pueden aprovechar el microambiente favorable de las raíces de plantas, sin alterar o formar nuevas estructuras (p.e. nódulos), a este fenómeno se le ha llamado simbiosis asociativa.

Diversas rizobacterias son consideradas promotoras del crecimiento vegetal, gracias a su capacidad de estimular directamente el proceso de desarrollo de las plantas por medio de múltiples mecanismos, como: el aporte de nitrógeno a través de la fijación del N₂ atmosférico, producción de sustancias reguladoras de crecimiento, solubilización de minerales y nutrientes, incremento en el volumen de la raíz e inducción de defensa sistémica a patógenos.

Sin embargo, el modo por el cual las BPCV logran colonizar la rizosfera aún no está totalmente claro; no obstante, se han propuesto algunos factores que favorecen este proceso, como la disponibilidad de una fuente de carbono, condiciones óptimas de humedad, desplazamiento de la bacteria por quimiotaxis y su capacidad de proliferar en la raíz. Además de las características de la planta, la disponibilidad de nutrientes en la rizosfera está controlada por los efectos que ejercen las propiedades del suelo sobre las interacciones de las raíces con los microorganismos. Gran variedad de especies bacterianas se encuentra catalogadas como promotoras de crecimiento vegetal, asimismo, dentro de este grupo están figurados algunos individuos de los géneros *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Acetobacter*, *Rhizobium* y *Arthrobacter* (Aviles-García *et al.*, 2016).

2.3. Género *Arthrobacter*

Los miembros del género *Arthrobacter* son bacterias comúnmente del suelo, Gram positivas, pertenecientes a la clase Actinobacteria. Este género comprende 70 especies reportadas hasta ahora. Son organismos pleomórficos, es decir, presentan una morfología de bacilo en la fase exponencial de crecimiento y una forma de cocos en su fase estacionaria (Figura 1). A medida

que avanza la fase exponencial, las varillas se acortan y finalmente son reemplazadas por las células cocoides; las células con forma de coco se forman mediante un acortamiento gradual de las barras en cada división sucesiva o bien, mediante la fragmentación múltiple de bacilos más grandes. En algunas cepas, las células cocoides son esféricas e idénticas en tamaño, en otras, presentan una forma ovoide o ligeramente alargadas y tamaño variado. Una característica distintiva del género es la forma que exhiben al momento de reproducirse; al dividirse las bacterias, la pared celular no se escinde completamente y permanecen unidas por la parte interna de la pared (Chen *et al.*, 2017), observándose en forma de “V”, a este proceso se le denomina *snapping division*. El tamaño de las células oscila entre 1 y 2 μm ; además tienen un alto contenido de G+C, aproximadamente de 60-72 mol %.

Las especies de este género utilizan sales de amonio y nitratos como fuentes de nitrógeno. Aprovechan la glucosa y en ocasiones, otros azúcares para obtener carbono; son aerobios estrictos, catalasa positivos, con una temperatura óptima de entre 20-30°C, aunque se han caracterizado organismos psicotolerantes en este género. Para su crecimiento, presentan un pH ideal de 7.0 aunque también toleran medios moderadamente alcalinos (Busse, 2016). Recientemente, especies del género *Arthrobacter* (*sensu lato*) han sido caracterizadas como BPCV, dentro de las cuales se encuentran: *A. nitroguajacolicus*, *A. nicotinovorans*, *A. humicola*, *A. oxydans*, y *P. chlorophenolicus* (Pereira y Castro, 2014; Fernández-González *et al.*, 2017).

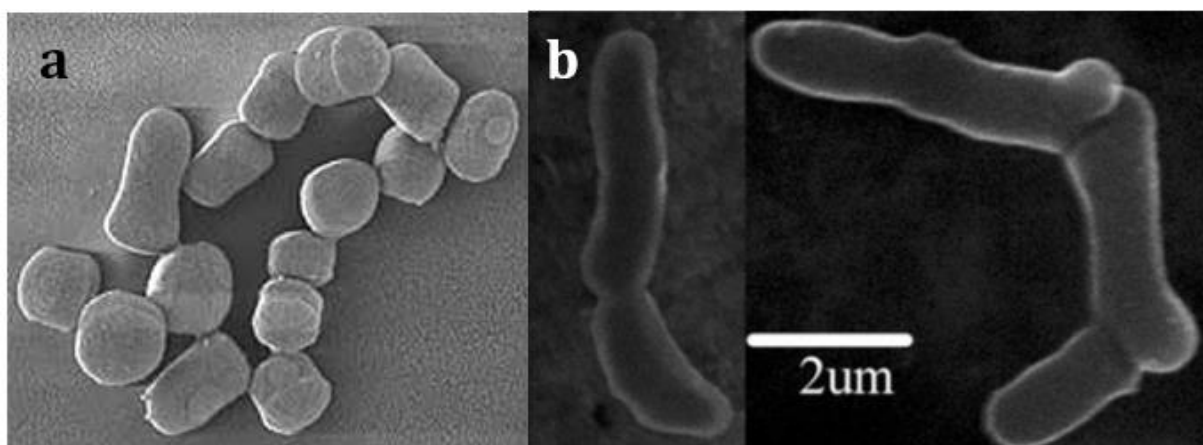


Figura 1. a) *Arthrobacter* sp. en fase estacionaria (coco). **b)** División en el género *Arthrobacter*. Se mantienen unidas las bacterias por la pared celular, mostrando una forma de “V” (Tomado de Chen *et al.*, 2017).

2.3.1. *Pseudarthrobacter chlorophenicus*

Pseudarthrobacter chlorophenicus es un organismo generalmente encontrado en suelo, aunque también es capaz de habitar en la filosfera y/o rizosfera de plantas. Es una bacteria Gram positiva, con un ciclo de vida bacilo-coco. Durante su morfología de bacilo presenta un tamaño de aproximadamente de 1 a 2 μm y en su fase de coco llega medir hasta 1 μm .

En placas de agar, las colonias son circulares, punctiformes, suaves, lisas y de una tonalidad grisácea. Esta bacteria se puede hallar en un rango de temperatura que va de 3-37°C siendo su temperatura óptima entre 20 y 30°C. Cabe resaltar que la cepa A6 de esta especie es utilizada en biorremediación ya que puede degradar compuestos xenobióticos tales como 4-Clorofenol (4-CF), 4-Nitrofenol (4-NF), 4-Bromofenol (4-BF) y otros fenoles para-sustituidos. 4-CF es un compuesto recalcitrante formado por cloración de aguas residuales, degradación anaerobia de fenoles altamente clorados (p.e. pentaclorofenol) y la descomposición de herbicidas tales como el ácido 2,4-diclorofenoxiacético; esta característica de biorremediación de la bacteria derivó su nombre científico (Westerberg *et al.*, 2000).

La cepa Mor30.16 fue aislada de la rizosfera de frijol (*Phaseolus vulgaris*) por el equipo del Laboratorio de Fisiología Molecular de Plantas y colaboradores. Su genoma ha sido secuenciado y mediante un análisis minucioso de nucleótidos se reveló que el 93.5% del genoma es idéntico al de *Pseudarthrobacter chlorophenicus* A6, mientras que la evaluación con el gen ribosomal 16S mostró una homología del 99.51%. Aunado a estas características, *P. chlorophenicus* es una bacteria promotora de crecimiento vegetal ya que se ha demostrado que tiene la capacidad de producir ácido indolacético, una fitohormona que favorece el desarrollo de raíces adventicias y laterales (Flores-Brito, 2017); asimismo este microorganismo posee una alta tolerancia a desecación, inanición, temperaturas elevadas y otros tipos de estrés ambientales (Miranda-Ríos *et al.*, 2015) que en buena medida se deben a la síntesis de solutos de bajo peso molecular compatibles con el metabolismo, denominados osmoprotectores.

2.4. Solutos compatibles

Gran variedad de organismos, incluyendo bacterias y plantas, logran adaptarse a condiciones extremas o estresantes del ambiente gracias a la producción de metabolitos que actúan como osmoprotectores; estos solutos compatibles son compuestos de bajo peso molecular, altamente

solubles e inoos en elevadas concentraciones. La acumulaci3n intracelular de estas mol3culas o compuestos ayudan a mantener un balance osm3tico y evitar efectos perjudiciales que la deshidrataci3n irreversible conlleva (Bownik y Stepniewska, 2015). Los organismos sintetizan y acumulan r3pidamente estos compuestos cuando se exponen repentinamente a circunstancias estresantes, para evitar un aumento indebido de la turgencia y eventual ruptura celular. Estos compuestos est3n divididos en diferentes grupos estructurales, en los que podemos encontrar: polioles, betaínas, amino3cidos y az3cares.

2.4.1. Polioles

Los polioles son compuestos de bajo peso molecular, polialcoholes de az3cares que pueden ser c3clicos o ac3clicos; aunque no se consideran metabolitos primarios, estudios de Merchant y Richter (2011) indican que el almacenamiento de estos incrementa la tolerancia ante distintos tipos estr3s ambiental en plantas. Diversas funciones de estas mol3culas han sido identificadas para los organismos vegetales, ya que su bios3ntesis se encuentra sumamente relacionada con el metabolismo primario; adem3s los polioles representan la forma m3s eficiente para almacenar y transportar carbono en plantas.

En este sentido, los polioles son uno de los principales osmolitos que se almacenan de forma intracelular cuando organismos vegetales y algunos hongos se encuentran bajo situaciones de estr3s ambiental. La acumulaci3n de polioles tiene como funci3n participar en el ajuste osm3tico de las c3lulas, as3 como facilitar el flujo de agua por la membrana plasm3tica (Shen *et al.*, 1999).

- Sorbitol

El sorbitol o glucitol ($C_6H_{14}O_6$; PM= 182.17 g/mol) es un alcohol hexah3drico que se obtiene a partir de glucosa. Es un compuesto cristalino, sin olor, dulce e higrosc3pico.

- Manitol

El manitol ($C_6H_{14}O_6$; PM= 182.17 g/mol) es un polialcohol, isómero del sorbitol. Se encuentra principalmente en exudados de árboles, algas marinas y algunos hongos.

2.4.2. Betaínas

- Glicina betaína

La glicina betaína ($C_5H_{11}NO_2$; PM= 117.15 g/mol) es un compuesto cuaternario de amonio, metabolito orgánico fácilmente soluble en agua y no es tóxico en altas concentraciones. Se encuentra presente en bacterias, algas, algunos animales y plantas. La síntesis de este compuesto tiene como principal función ajustar el potencial osmótico celular interno para compensar el potencial osmótico externo y de esta forma, evitar la pérdida de turgencia. A través de este mecanismo, las células de los organismos logran estabilizar las macromoléculas que las componen; evitan la degradación de proteínas y mantiene la integridad de las membranas. Cabe resaltar que *P. chlorophenolicus* Mor30.16 posee los genes involucrados en la biosíntesis de este metabolito.

2.4.3. Aminoácidos osmoprotectores

- Prolina

La prolina ($C_5H_9NO_2$; PM= 115.13 g/mol) es uno de los veinte aminoácidos esenciales (o más bien, iminoácido). Es una molécula hidrofóbica, apolar y no aromática. Muchas plantas y microorganismos acumulan prolina como respuesta a un estrés osmótico, actúa como protector contra el daño causado por salinidad y sequía; dependiendo del organismo, de la severidad y duración del estrés abiótico, la concentración de prolina en seres vivos puede llegar a niveles de milimolar. Estudios de Ashraf y Fooland del 2007 sugieren que la acumulación de prolina contribuye al ajuste osmótico celular, ayuda a estabilizar estructuras subcelulares (proteínas y membranas), participa en la eliminación de radicales libres y mantiene el potencial redox celular bajo condiciones de estrés.

- Ácido glutámico

El ácido glutámico o glutamato ($C_5H_9NO_4$; PM= 147.13 g/mol) es un aminoácido esencial, pertenece a la clasificación de aminoácidos ácidos, debido a su cadena lateral, la cual presenta un grupo carboxilo que al desprotonarse exhibe una carga negativa.

La acumulación de glutamato ha sido observada en varias especies de bacterias crecidas en medios hiperosmolares. Investigaciones recientes indican una correlación en la síntesis y almacenaje de este aminoácido en bacterias y otros organismos cuando se encuentran bajo algún escenario de estrés abiótico. Por ejemplo, Tortone y Lucchesi, en 2005 lograron dilucidar el rol que ejerce el glutamato en la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* cuando se encuentra en un medio hiperosmolar. *P. aeruginosa* es capaz de sintetizar e incorporar glutamato exógeno para modular su adaptación bajo un escenario de estrés osmótico, asimismo, puede incorporar otros tipos de osmoprotectores adicionales (en este caso colina), lo que deriva en un efecto sinérgico entre las diferentes moléculas, las cuales coadyuvan a mitigar los efectos nocivos que el medio hiperosmolar genera en la célula.

2.4.4. Azúcares

- Disacáridos

Existen carbohidratos (disacáridos especialmente) que pueden funcionar como osmoprotectores ya que su acumulación intracelular previene los efectos del estrés abiótico.

La sacarosa ($C_{12}H_{22}O_{11}$; PM= 342 g/mol) es un disacárido formado por una molécula de glucosa y fructosa juega un rol importante regulando el crecimiento de plantas y su tolerancia hacia el estrés ambiental; es por esto que el transporte y distribución de sacarosa en distintos tejidos vegetales es vital para un desarrollo óptimo de estos. Por otro lado, la trehalosa es un azúcar que es capaz de proteger y estabilizar la estructura y función de enzimas, proteínas y membranas celulares bajo condiciones de desecación, altas temperaturas, congelación, alta salinidad, radiación y oxidación (Crowe *et al.*, 1984).

2.5. Trehalosa

La trehalosa (α -D-glucopiranosil-(1,1)- α -D-glucopiranosido; $C_{12}H_{22}O_{11}$; PM= 342.31 g/mol), es un disacárido no reductor formado por dos moléculas de glucosa (Figura 2); el enlace α , α -1,1 conecta los dos extremos reductores de los residuos de glucosa, anulando su poder reductor.

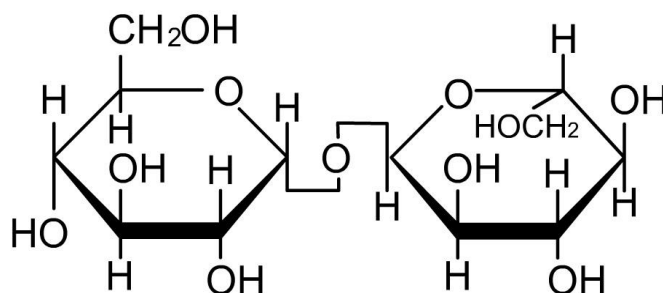


Figura 2. Molécula de trehalosa que muestra el enlace α -1, 1 entre las unidades de glucosa.

Este disacárido se encuentra presente en una amplia gama de organismos, funciona principalmente como osmoprotector y azúcar de reserva, es decir, puede ser hidrolizado y dar origen a dos moléculas de glucosa.

La trehalosa posee una gran actividad bajo condiciones extremas, derivado de que el enlace glicosídico posee una energía de $4.184 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, en comparación con la sacarosa, donde el mismo tiene una energía de $113 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ (Schiraldi *et al.*, 2002). Se ha demostrado que las proteínas mantienen mejor su actividad bajo estrés abiótico en presencia de este azúcar, ya que restaura el estado de solvatación de la molécula deshidratada, protegiendo su estructura terciaria y evidentemente su función (Figura 3). Esta interacción está dada en ambas moléculas por puentes de hidrógeno entre los grupos polares de la proteína y los hidroxilos del azúcar.

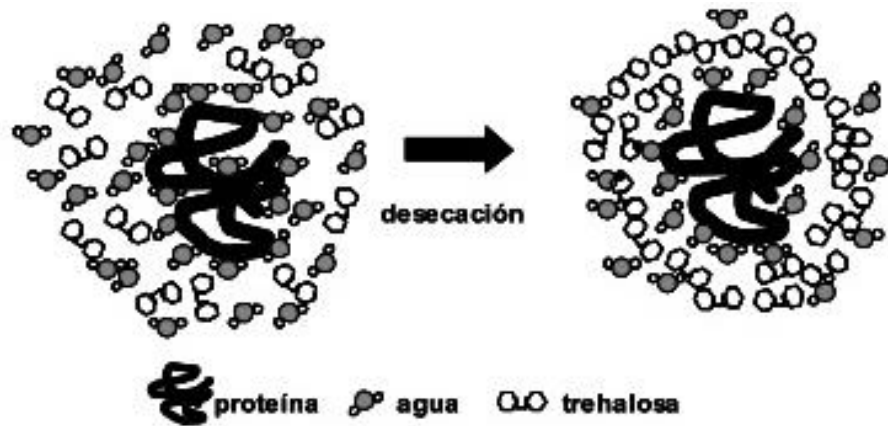


Figura 3. Moléculas de trehalosa interaccionando con proteínas a través de puentes de hidrógeno, evitando la pérdida de la estructura terciaria (Tomado de Mascorro-Gallardo *et al.*, 2005).

Asimismo, la trehalosa favorece la permanencia del estado fluido de membranas celulares previniendo la fusión, separación de fases y rompimiento ya que interactúa con las cabezas polares de los lípidos (Figura 4). Este disacárido retarda la transición de líquido a gel mediante el reemplazo de las moléculas de agua por trehalosa, manteniendo el estado de agregación óptimo de las membranas.

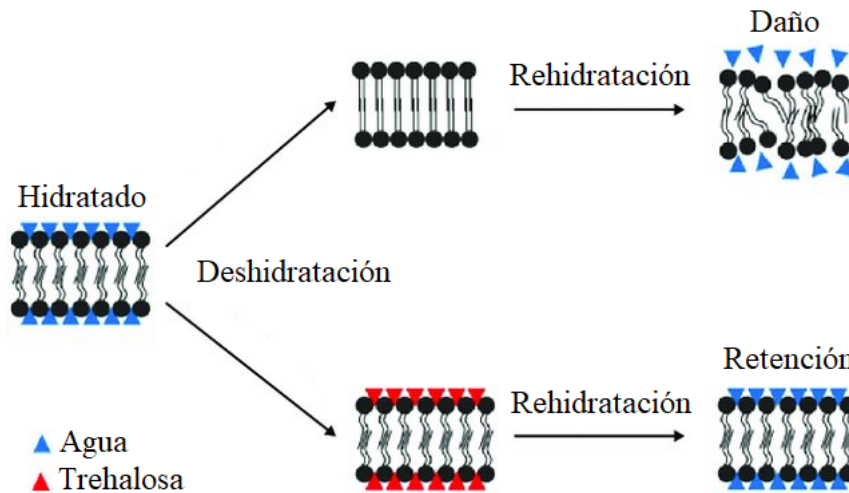


Figura 4. Interacción de la trehalosa con membranas celulares en condiciones de deshidratación. Mantiene los lípidos de membrana en estado líquido evitando su fusión y rompimiento (Tomado de Rozsypal, 2015).

2.5.1. Organismos que sintetizan trehalosa

La trehalosa es prácticamente una molécula ubicua ya que se encuentra en una amplia variedad de organismos, incluyendo bacterias, arqueobacterias, plantas, hongos e insectos (Figura 5). Todos los seres vivos pueden sintetizar este azúcar, excepto los vertebrados (Paul *et al.*, 2008). Este disacárido fue descrito en 1832 como un azúcar presente en el cornezuelo del centeno (*Claviceps purpurea*), un hongo patógeno para el humano; asimismo, esta molécula se designó con el nombre de trehalosa ya que se encontró en capullos y pupas del escarabajo *Larinus maculata*, cuyo nombre común es “trehala”.

La biosíntesis de trehalosa había sido relacionada únicamente con organismos anhidrobiontes originalmente, como el tardígrado *Echiniscus blumi*, la planta vascular inferior *Selaginella lepidophylla* y en angiospermas como *Myrathamus flabellifolius* y *Sporobulus atrovirens* (Mascorro-Gallardo *et al.*, 2005). Sin embargo, la construcción de bancos de secuencias de ADN y proteínas han facilitado la disponibilidad de información logrando identificar genes de biosíntesis de trehalosa en diversas especies. En bacterias, principalmente de los géneros *Mycobacteria*, *Nocardia*, *Rhodococcus* y *Corynebacterium*, la trehalosa está presente en glicolípidos de la pared celular. Por otro lado, en levaduras la trehalosa ha sido caracterizada como respuesta adaptativa ante distintos tipos de estrés abiótico, también es utilizada como compuesto de reserva y se ha demostrado que el intermediario trehalosa-6-fosfato es un regulador del flujo metabólico de glucosa durante la glucólisis. En insectos, este disacárido es el azúcar más abundante en la hemolinfa (del 80-90%). Cabe resaltar que en plantas juega un papel importante durante las etapas de formación del embrión y floración. Además, la trehalosa regula el metabolismo del carbono durante la fotosíntesis (Mascorro-Gallardo *et al.*, 2005).

2.5.2. Rutas de biosíntesis y degradación

Existen cinco vías de biosíntesis de trehalosa (Figura 5), distribuidas en diferentes organismos muy distantes en su historia evolutiva; sin embargo, la ruta más común es en la que intervienen dos enzimas, la trehalosa-6-fosfato sintasa y la trehalosa-6-fosfato fosfatasa (llamada respectivamente OtsA/OtsB en procariontes y TPS/TPP en eucariontes). OtsA o TPS cataliza la condensación de UDP-glucosa y glucosa-6-fosfato para formar trehalosa-6-fosfato (t6p), la cual

posteriormente es desfosforilada por la enzima OtsB o TPP dando origen a una molécula de trehalosa y un fosfato. Esta ruta es codificada por los genes *TPS1/TPS2* en eucariontes y en procariontes por *otsA/otsB*.

No obstante, en bacterias se ha reportado adicionalmente dos rutas alternas para producir trehalosa. Una de ellas caracterizada como *treY/treZ* (o *MTS/MTH*) donde se utilizan maltodextrinas (maltooligosacáridos, almidón y glucógeno) como sustrato, en donde la enzima malto-oligosil trehalosa sintasa (TreY o MTS) a través de una transglicosilación modifica el enlace terminal $\alpha(1-4)$ no reductor a uno $\alpha(1-1)$ formando una unidad trehalosil terminal. Después, la enzima malto-oligosil trehalosa hidrolasa (TreZ o MTH) rompe el enlace por hidrólisis, liberando una molécula de trehalosa.

En la otra vía desarrollada por bacterias, denominada *treS* o *GT*, a partir de maltosa como sustrato, se modifica por transglicosilación el enlace $\alpha(1-4)$ a $\alpha(1,1)$ catalizada por la enzima trehalosa sintasa (TreS). La cuarta ruta de biosíntesis es conocida como *TreP*; la enzima trehalosa fosforilasa (TreP) utiliza como sustratos glucosa y glucosa-1-fosfato, formando trehalosa y un Pi. La última vía de producción de trehalosa conocida es la *treT*, en donde se emplea ADP-glucosa o GDP-glucosa y glucosa como sustratos. La enzima trehalosa glicosil-transferasa sintasa (TreT) cataliza la reacción, formando una molécula de trehalosa. Este disacárido es degradado por la enzima trehalasa (TreH), la cual hidroliza el enlace O-glucosídico para originar dos moléculas de glucosa. Es por esto por lo que la trehalosa puede ser utilizada como azúcar de reserva.

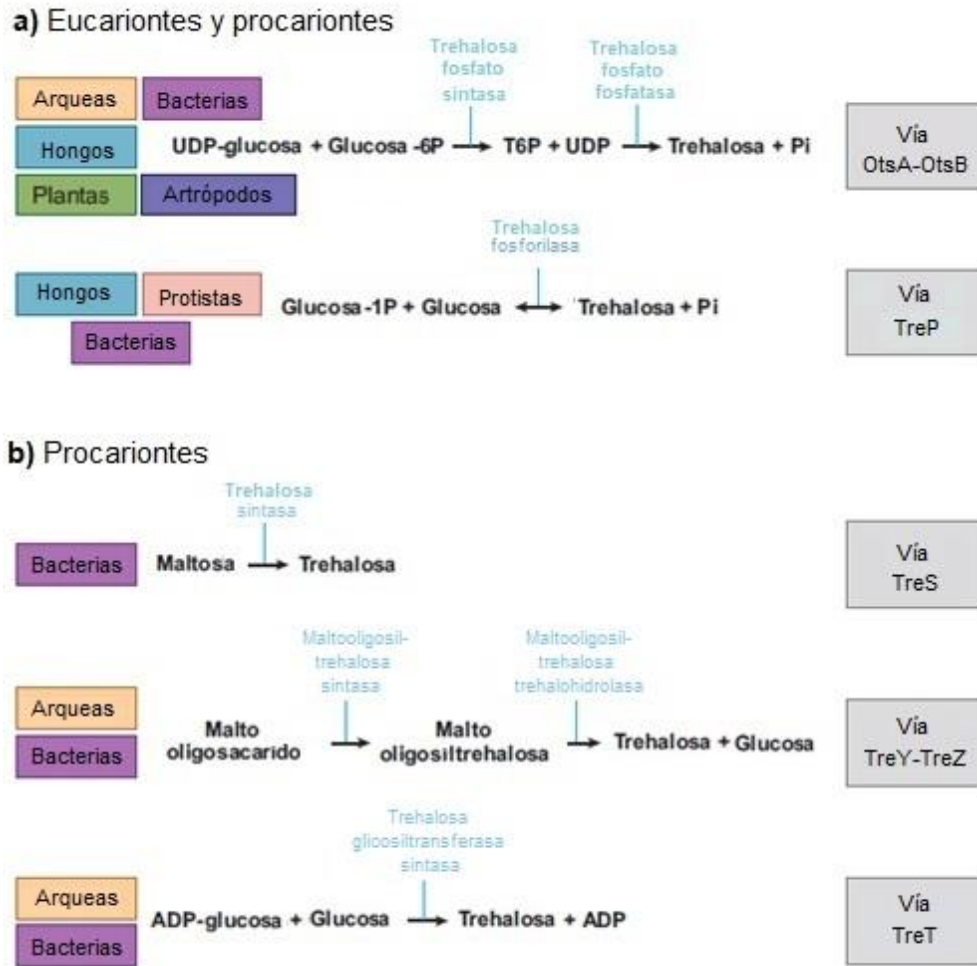


Figura 5. Rutas de biosíntesis de trehalosa y su distribución en los tres dominios; en letras de color azul se muestran las enzimas que catalizan cada reacción (Tomado de Paul *et al.*, 2008).

2.5.3. Vía OtsA/OtsB

La ruta OtsA/B, también conocida como TPS/TPP es la forma dominante y preferencial por la cual los organismos sintetizan trehalosa. Cabe resaltar que es la única ruta biosintética para producir trehalosa hallada en eucariontes (Avonce *et al.*, 2006). Como se ha mencionado anteriormente, en esta vía intervienen dos enzimas (Figura 6), la trehalosa-6-fosfato sintasa (OtsA/TPS) y trehalosa-6-fosfato fosfatasa (OtsB/TPP); la primera, cataliza la condensación de UDP-glucosa (o GDP-glucosa) y glucosa-6-fosfato para formar el intermediario trehalosa-6-fosfato. La segunda enzima, desfosforila este intermediario, originando una molécula de trehalosa y un fosfato.

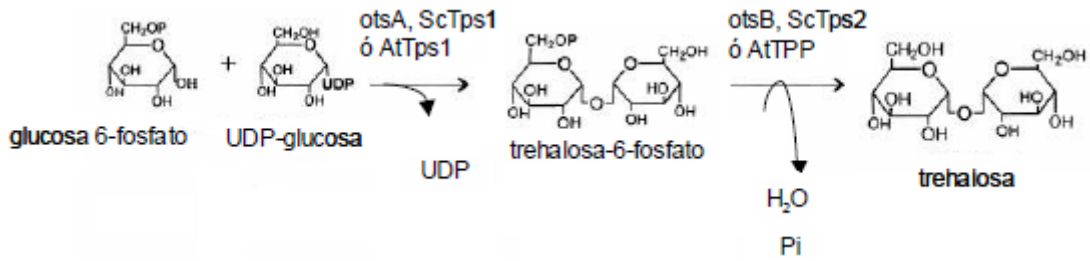


Figura 6. Fases de la vía OtsA/OtsB, en donde intervienen dos enzimas, la trehalosa-6-fosfato sintasa (OtsA) y trehalosa-6-fosfato fosfatasa (OtsB) (Tomada de Mascorro-Gallardo *et al.*, 2005).

En la mayoría de las bacterias, los genes que codifican para las proteínas OtsA/B están dispuestos en el cromosoma a modo de operón, codificando para una proteína con un solo dominio catalítico funcional. Esta organización permite una co-regulación entre ambos genes. Sin embargo, en eucariontes la disposición de estos genes es distinta, ya que hay familias multigénicas en las que cada miembro codifica para una proteína con ambos dominios fusionados (TPS y TPP), empero, solo presenta actividad catalítica uno de ellos; esta organización física indica que tanto las enzimas TPS como las TPP descienden de un ancestro común en eucariontes (Avonce *et al.*, 2006).

2.5.3.1. TPS/TPP en *Saccharomyces cerevisiae*

El metabolismo de la trehalosa ha sido estudiado minuciosamente en el hongo unicelular *Saccharomyces cerevisiae* y debido a esto, es que este organismo se ha utilizado como modelo para dilucidar la manera en que la trehalosa es sintetizada en la vía TPS/TPP, así como la función de cada una de las proteínas involucradas; también se ha podido extrapolar los resultados y comprender el papel que este disacárido desempeña cuando organismos son sometidos en algún tipo de estrés ambiental.

En *S. cerevisiae*, bajo condiciones de estrés abiótico e inanición, los niveles de trehalosa incrementan del 1 al 20% en el peso seco celular. En este microorganismo, la trehalosa es sintetizada por una sola vía, la denominada TPS/TPP, en donde se ve implicado un complejo enzimático de cuatro subunidades (Figura 7), que comprende: trehalosa-fosfato sintasa (TPS), codificado por *TPS1*, trehalosa-fosfato fosfatasa (TPP) codificado en *TPS2* y dos unidades regulatorias, TPS3 y TSL1 (Trevisol *et al.*, 2014); aunque estas dos subunidades no poseen actividad catalítica, sino estructural y regulatoria, las secuencias presentan homología con los

genes *TPS1* y *TPS2* (Vandercammen *et al.*, 1989). Sin embargo, TPS3 y TSL1 no interactúan, más bien lo hacen con TPS1 y TPS2, pero tienen la función de dar estabilidad al complejo enzimático. Asimismo, se ha demostrado la capacidad regulatoria que ejercen, ya que TPS3 y TSL1 poseen dos y cuatro sitios de fosforilación respectivamente, los cuales son *motifs* de proteínas cinasas dependientes de AMPc (PKA) (Trevisol *et al.*, 2014).

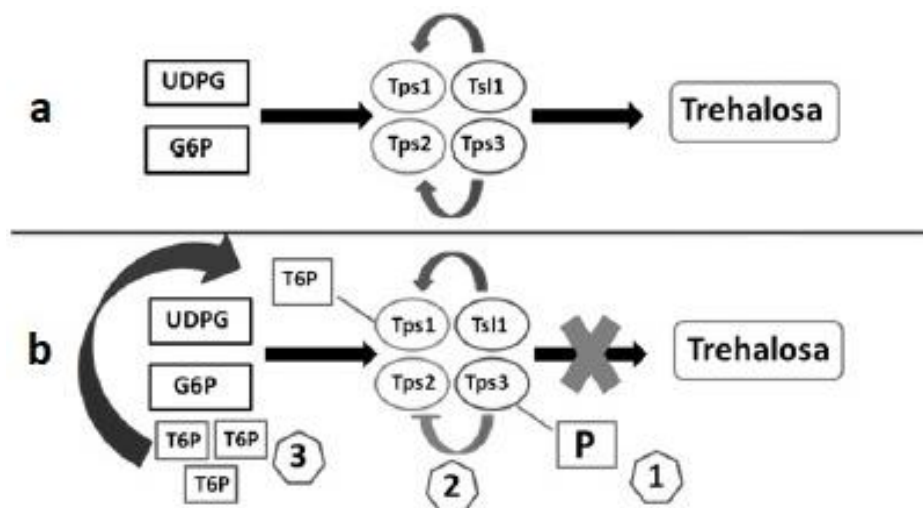


Figura 7. Complejo enzimático TPS/TPP de *S. cerevisiae*, formado por cuatro subunidades: TPS1 de 56 kDa (TPS), TPS2 de 100 kDa (TPP) y TSL1 con TPS3, originando una subunidad regulatoria y estructural; **a)** síntesis de trehalosa por el complejo enzimático, **b)** regulación de la actividad catalítica mediante la fosforilación de TPS3 e incremento de t6p (Tomado y modificado de Trevisol *et al.*, 2014).

Adicionalmente, investigaciones apuntan que una elevada concentración de trehalosa-6-fosfato puede inhibir la actividad de la trehalosa-fosfato sintasa. Aunado a esto, se ha logrado caracterizar algunas otras funciones dentro de la célula con las que cada una de las subunidades contribuye. Se conocen efectos pleiotrópicos que tienen origen en mutaciones en *TPS1* y *TPS2*; levaduras mutantes $\Delta TPS1$ son deficientes para crecer en azúcares fermentables, principalmente glucosa, debido a que la subunidad catalítica trehalosa-fosfato sintasa (TPS) regula el flujo de glucosa en la glucólisis (Neves *et al.*, 1995). Por otro lado, se ha demostrado que la expresión de *TPS2* es inducida por shock térmico; levaduras mutantes $\Delta TPS2$ se tornan termosensibles, son incapaces de crecer a 39°C ya que acumulan grandes cantidades de trehalosa-6-fosfato, ocasionando un uso excesivo de Pi y, derivado de esto, una disminución intracelular de ATP (De Virgilio *et al.*, 1993).

2.5.3.2. Enzima OtsB

La enzima trehalosa-fosfato fosfatasa pertenece a la superfamilia deshalogenasas haloácidas (HAD), las cuales, comprenden enzimas con actividad hidrolasa, particularmente fosfatasas y ATPasas (Kuznetsova *et al.*, 2015). Las proteínas pertenecientes a esta familia poseen características estructurales conservadas; en su mayoría presentan tres *motifs*: por un lado, el *motif* I contiene dos residuos de ácido aspártico (*DXD*), mientras que los *motifs* II y III presentan las secuencias (*S/T*)*GR* y *GDD* respectivamente; estos tres *motifs* forman en conjunto el sitio activo. Cabe resaltar que es común en este grupo de enzimas, hallar dos dominios altamente conservados. El dominio *Core*, formado por un arreglo α/β , consta de 6 hojas beta paralelas, rodeadas de 6 alfa hélices, es una versión modificada del plegamiento Rossmann (Mascorro-Gallardo *et al.*, 2005) y precisamente es en este dominio donde se lleva a cabo la catálisis de reacción. Mientras tanto, el dominio *Cap* está dado por 2 α -hélices flanqueando 4 láminas beta, cubriendo el sitio catalítico. Asimismo, esta organización de dominios, al formar una hendidura, hacen estructuralmente posible la unión con los sustratos.

Al igual que las enzimas pertenecientes a HAD, OtsB utiliza Mg^{2+} como cofactor para unirse correctamente a t6p; en general exhiben un pH óptimo ligeramente ácido, de 5-7.5. A diferencia con otras fosfatasas, se ha demostrado que OtsB presenta alta especificidad para trehalosa-6-fosfato (Figura 8).

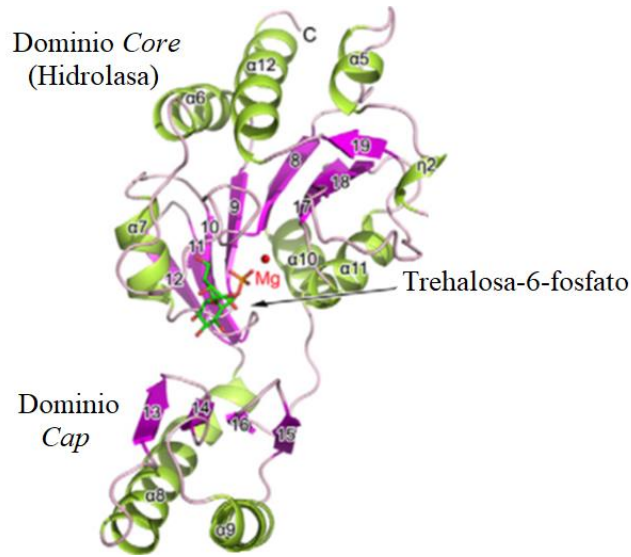


Figura 8. Enzima OtsB (trehalosa-fosfato fosfatasa). La topología de estas enzimas está dada por dos dominios conservados, el dominio *Core* y *Cap*; se puede observar en color verde una molécula de trehalosa-6-fosfato en el sitio activo, mientras que con un punto rojo se muestra un átomo de magnesio, el cual es utilizado como cofactor (Tomado y modificado de Shan *et al.*, 2016).

En la vía de síntesis de trehalosa OtsA/B, OtsB cataliza la desfosforilación del intermediario t6p a través de una hidrólisis fosfomonoéster (Figura 9) para formar una molécula de trehalosa libre.

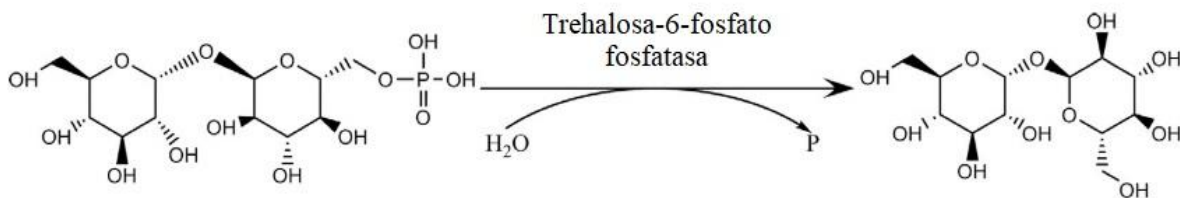


Figura 9. Segundo paso de la vía TPS/TPP, formación de trehalosa (Shan *et al.*, 2016).

2.6. Glicosil hidrolasas

Las glicosil hidrolasas (EC 3.2.1-3.2.3) son un grupo extenso de enzimas capaces de romper enlaces glucosídicos entre dos o más carbohidratos. Debido a la gran diversidad de hidratos de carbono y las distintas funciones que desempeñan en los seres vivos, de la misma forma, las enzimas de este grupo se han ido especializando para una catálisis selectiva (Henrissat *et al.*,

1996). Las glicosil hidrolasas juegan un rol esencial en los organismos, ya que están implicadas en diversos procesos, tales como la hidrólisis de carbohidratos estructurales o de reserva, reemplazo de carbohidratos de la superficie celular, defensa contra patógenos, etc.

Dentro de este grupo, las enzimas han sido clasificadas en más de 45 familias de acuerdo con su similitud en la estructura primaria; aunque, se ha comprobado que enzimas de distintas familias pueden tener estructuras terciarias similares.

2.6.1. Familia 15 de las glicosil hidrolasas

La familia 15 de las glicosil hidrolasas (EC 3.2.1) es una familia de enzimas que degradan enlaces $\alpha(1-4)$, $\alpha(1-6)$ y $\alpha(1-1)$ de carbohidratos, específicamente en los extremos no reductores de la molécula. Según la base de datos *Carbohydrate-Active enZymes* (CAZY; <http://www.cazy.org/>) dentro de este grupo se encuentran enzimas con actividad glucoamilasa (GA), glucodextranasa (GDE) y trehalasa (TreH). En la tabla 1 se muestran algunas de las diferencias entre cada una de estas moléculas.

Tabla 1. Diferencias entre miembros de GH15; cada tipo de enzima es afín a un sustrato distinto ya que pueden hidrolizar enlaces glicosídicos específicos.

Enzima	Enlace que hidroliza	Sustrato
Glucoamilasa (GA)	$\alpha(1-4)$	Almidón
Glucodextranasa (GDE)	$\alpha(1-6)$	Dextrano, isomaltosacáridos
Trehalasa (TreH)	$\alpha(1-1)$	Trehalosa

Investigaciones de Buchholz y Seibel en 2008 señalan que el dominio catalítico de los miembros de esta familia consiste en un barril (α/α)₆, es decir, 6 α -hélices interiores rodeadas de 6 α -hélices externas (Figura 10). Asimismo, dentro de la cavidad formada por esta topología, se albergan cinco motivos que de forma concomitante estructuran el sitio activo (Tabla 2).

Tabla 2. Motivos que forman el sitio activo en GH15; los residuos de ácido glutámico subrayados en los *motifs* III y V se encuentran conservados independientemente del tipo de actividad (GA, GDE o TreH).

<i>Motif</i>	Secuencia
I	W(I/S)RD
II	SRPVRI / AXFP(I/Y)
III	(I/R)W <u>E</u>
IV	DDG(L/Y)
V	<u>E</u> (E/Q)XXXXXTGL

A pesar de que estos motivos se encuentren en los miembros pertenecientes a la familia GH15, las secuencias de cada *motif* pueden variar de acuerdo con el tipo de enzima en que esté presente, sin embargo, los residuos de ácido glutámico de los motivos III y V son altamente conservados, ya que son los aminoácidos más relevantes para llevar a cabo la catálisis, debido a que se encargan de realizar el ataque nucleofílico (Sakaguchi *et al.*, 2015), protonando el oxígeno del enlace glicosídico y tomando un protón del agua.

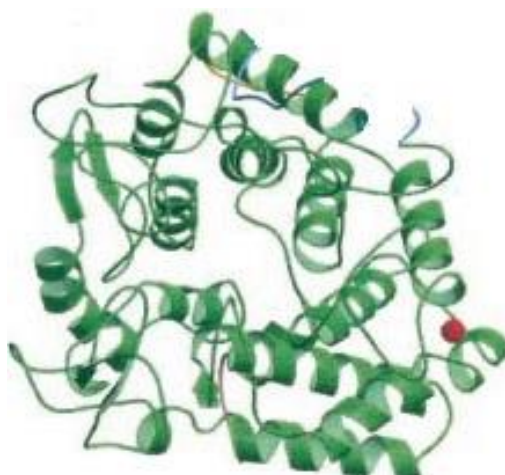


Figura 10. Barril (α/α)₆; dominio conservado en las GH15. Es una estructura toroide en cuya cavidad yacen los cinco motivos que conforman el sitio activo (Tomado y modificado de Mizuno *et al.*, 2004).

3. ANTECEDENTES

3.1. OtsA/B bifuncional de *Cytophaga hutchinsonii*

Reportes de Avonce y colaboradores demostraron en 2010 la única enzima bifuncional TPS-TPP conocida hasta el momento. Esta proteína posee dos dominios catalíticos funcionales formando parte de una misma proteína, uno de ellos presenta actividad trehalosa-fosfato sintasa y el otro muestra función trehalosa-fosfato fosfatasa (OtsA-B); fue hallada en *Cytophaga hutchinsonii*, una bacteria Gram negativa que habita comúnmente en suelos.

A través de la expresión de *otsB* bifuncional en *S. cerevisiae* $\Delta TPS1$ $\Delta TPS2$, se logró restaurar los efectos fenotípicos consecuentes de dichas mutaciones, es decir, las levaduras volvieron a crecer en medios con glucosa como fuente de carbono y se perdió la termosensibilidad, observando crecimiento de colonias a 39°C.

3.2. OtsB2 de *Mycobacterium tuberculosis*

En 2016, Shan y colaboradores caracterizaron una enzima trehalosa-6-fosfato fosfatasa perteneciente al microorganismo *M. tuberculosis*, la cual presentaba algunas cualidades particulares. Gracias al análisis del genoma de esta bacteria, se lograron identificar dos genes homólogos a *otsB*, sin embargo, únicamente el producto de *otsB2* exhibía actividad TPP; sin embargo, al realizar estudios estructurales de la enzima, como predicciones del plegamiento *in silico* y cristalografía de rayos X, demostraron que esta proteína posee un dominio N-terminal de 120 aminoácidos que no se encuentra en ninguno de los miembros de la superfamilia HAD.

Este dominio extra, consta de 7 β -plegadas, flanqueadas por 2 α -hélices de cada lado. El estudio de la función de este dominio reveló que esta región brinda estabilidad al sitio catalítico, ya que estructuralmente, mejora la unión de la enzima al sustrato, así como protege el sitio activo del exterior. Además, demostraron que truncar este dominio lleva como consecuencia, la pérdida de ~70% de la actividad de la enzima; asimismo, determinaron un sitio de fosforilación en el dominio N-terminal que, presuntamente, puede ser un mecanismo de regulación de la actividad enzimática.

3.3. OtsB2 de *Pseudarthrobacter chlorophenicus* Mor30.16

Miranda-Ríos y colaboradores lograron en 2015 aislar a partir de la rizosfera de plantas de frijol en Cuernavaca, Morelos, una cepa de *Pseudarthrobacter chlorophenicus* que acumula trehalosa de manera natural. El genoma fue secuenciado y anotado; gracias a esto, se identificaron tres rutas de biosíntesis de trehalosa: la vía OtsA/OtsB, TreY/TreZ y TreS. Sin embargo, se determinaron dos secuencias pertenecientes a *otsB*, una de ellas más grande que los genes reportados previamente. Mientras que *otsB1* de *P. chlorophenicus* está constituido por 828 pb, *otsB2* se compone por 2628 pb. A través de estudios con programas bioinformáticos, se determinó que OtsB2 putativa se conforma con 876 aminoácidos, lo que deriva en un peso molecular aproximado de 94.02 kDa y un pI teórico de 5.24; asimismo, se predijo la actividad de ambas proteínas; por medio de un análisis de dominios con el programa InterPro, se reveló que *otsB1* codifica para una enzima trehalosa-fosfato fosfatasa (Figura 11), por otro lado, la secuencia *otsB2* se traduce en una enzima putativa con dos dominios catalíticos, uno perteneciente a OtsB y un dominio adicional que atañe a una glicosil hidrolasa de la familia 15 (Figuras 12 y 13).

Detailed signature matches

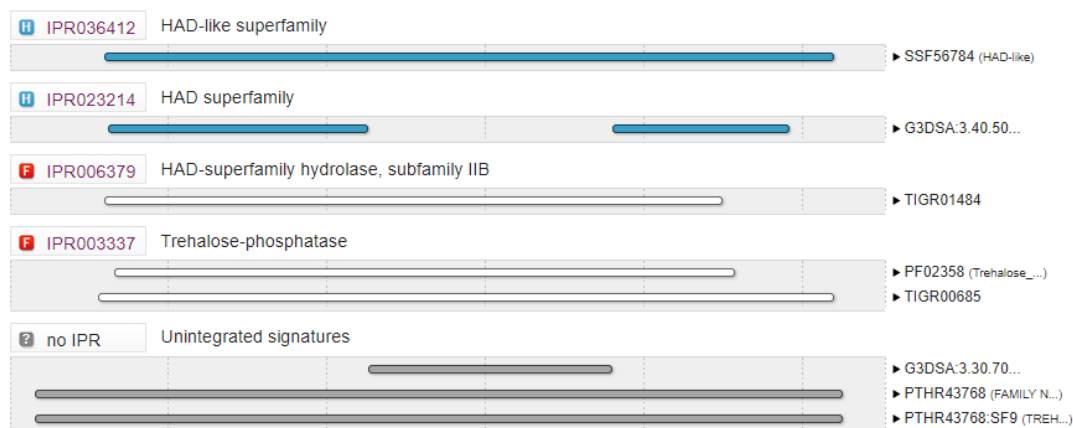


Figura 11. Análisis de dominios de OtsB1 con el programa InterPro. Las barras blancas indican que esta enzima corresponde a una trehalosa-fosfato fosfatasa.

Detailed signature matches

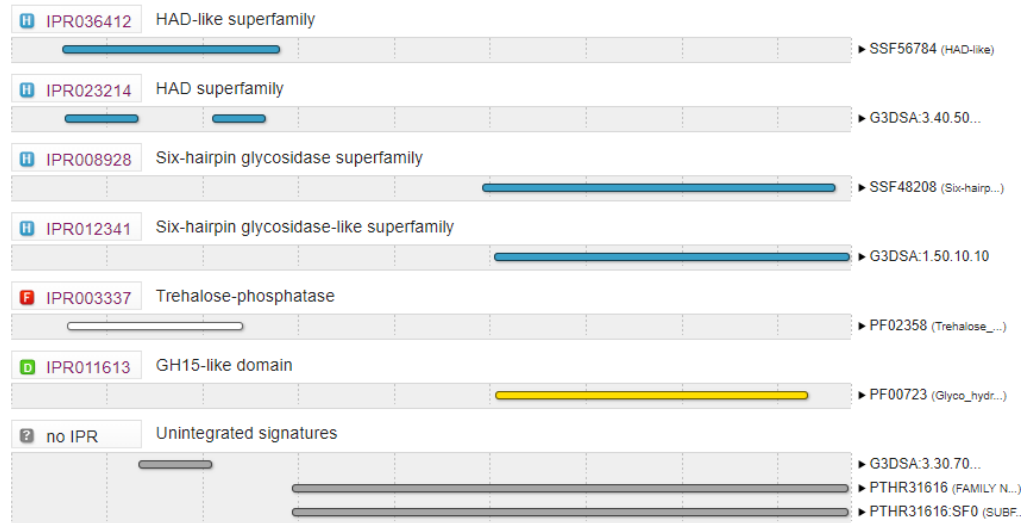


Figura 12. Análisis de dominios de OtsB2 con el programa InterPro; las barras blancas señalan el dominio trehalosa-fosfato fosfatasa, mientras que en amarillo se muestra el dominio C-terminal, correspondiente a una glicosil hidrolasa tipo 15.

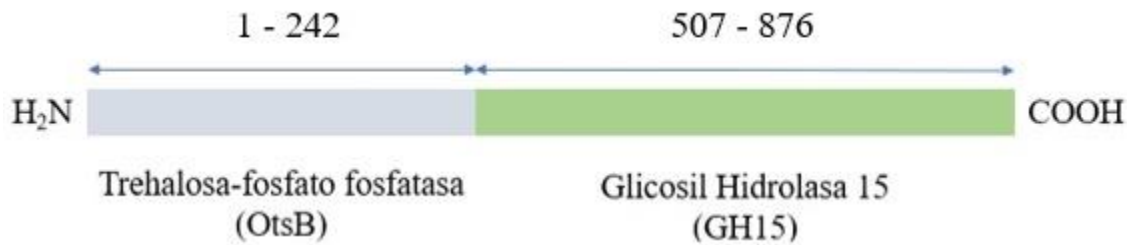


Figura 13. Representación de la enzima putativa OtsB2; de manera gráfica se muestran los dos dominios predichos por el programa InterPro.

4. JUSTIFICACIÓN

Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal que acumulan trehalosa pueden sobrevivir en condiciones de estrés abiótico; comprobar la funcionalidad de OtsB2 de *P. chlorophenolicus* Mor30.16 nos proporcionará una manera más clara de la forma en que este organismo puede metabolizar dicho disacárido. Aunado a esto, han sido pocos los reportes de enzimas OtsB con más de un dominio catalítico.

5. HIPÓTESIS

La enzima OtsB2 de *Pseudarthrobacter chlorophenolicus* presenta actividad catalítica de trehalosa-6-fosfato fosfatasa y glicosil hidrolasa 15.

6. OBJETIVOS

6.1. Objetivo general

Inferir e identificar las actividades catalíticas de la enzima OtsB2.

6.2. Objetivos particulares

- Complementar levaduras mutantes $\Delta TPS2$ a través de la expresión de OtsB2.
- Identificar en OtsB2 los motivos que estructuran el sitio activo en las enzimas trehalosa-fosfato fosfatasas.
- Determinar el porcentaje de identidad de OtsB2 y miembros de la familia 15 de glicosil hidrolasas.
- Identificar en OtsB2 los cinco *motifs* característicos de la familia 15 de glicosil hidrolasas.
- Expresar heterológamente la enzima OtsB2 en *E. coli*.

7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

En la figura 14 se muestra gráficamente la estrategia experimental que se llevó a cabo para el desarrollo del presente trabajo.

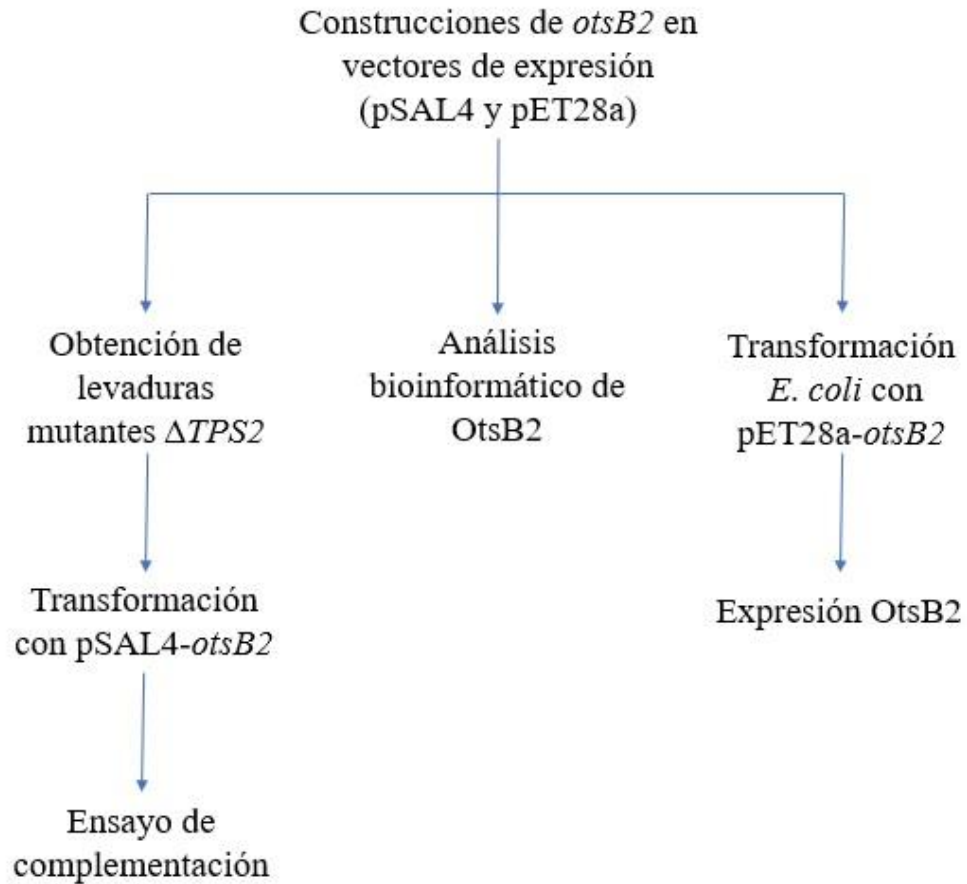


Figura 14. Metodología empleada.

8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1. Material biológico

8.1.1. Cepas bacterianas y fúngicas

Se empleó a *Saccharomyces cerevisiae* cepa W303-1A (*MATa, leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11,15*) para la construcción de mutantes Δ *TPS2*, así como para su transformación con vectores de expresión. Por otro lado, se hizo uso de la cepa DH5 α de *E. coli* ($F^- \phi 80lacZ\Delta M15 \Delta(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17(rk^-, mk^+) poa supE44 \lambda^- thi-1 gyrA96 relA1$) para transformarla con los vectores pSAL4. Además, se utilizaron las cepas de *E. coli* BL21 (DE3) ($F^- ompT hsdS_B (r_B^-, m_B^-) gal dcm$) y SHuffle ($F' lac, pro, lacIq / \Delta(ara-leu)7697 araD139 fhuA2 lacZ::T7 gene1 \Delta(phoA)PvuII phoR ahpC^* galE (or U) galK \lambda att::pNEB3-r1-cDsbC (SpecR, lacIq) \Delta trxB rpsL150(StrR) \Delta gor \Delta(malF)3$) para expresar el gen *otsB2* de *P. chlorophenolicus* Mor30.16.

8.1.2. Plásmidos

Los plásmidos fueron aportados por el Laboratorio de Fisiología Molecular de Plantas, el cual cuenta con las construcciones de *otsB2* en vectores. Se utilizó el plásmido pSAL4 (Mascorro-Gallardo *et al.*, 1996) y pET28a(+) para expresar en *S. cerevisiae* y en *E. coli* respectivamente (Figuras 15 y 16). Los vectores pSAL4 cuentan con las construcciones *otsB2* y *otsB2* Δ GH15 (secuencia original y uno con delección en un nucleótido del dominio glicosil hidrolasa) de *P. chlorophenolicus*, un inserto de una fusión de *TPS1/TPS2* de *S. cerevisiae* (control). También, se empleó el plásmido pDEST32 para la amplificación del marcador molecular *LEU2* (Figura 17). Los mapas de los vectores fueron realizados con el programa SnapGene®.

- pSAL4

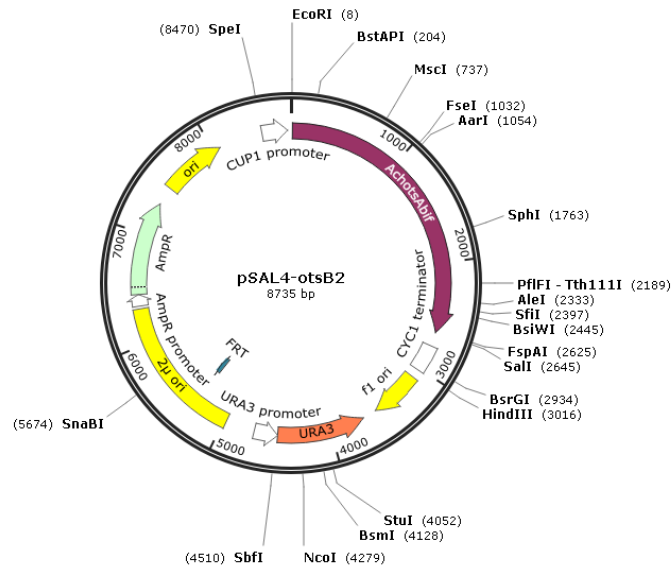


Figura 15. Vector de expresión pSAL4 para *S. cerevisiae*. Contiene el marcador molecular URA3 el cual restaura la auxotrofia de uracilo en la cepa W303-1A. Además, posee un promotor de la transcripción inducible por cobre. Se cuentan con tres construcciones en este plásmido, *otsB2*, *otsB2ΔGH15* y una fusión *TPS1/TPS2* de *S. cerevisiae*.

- pET28a(+)

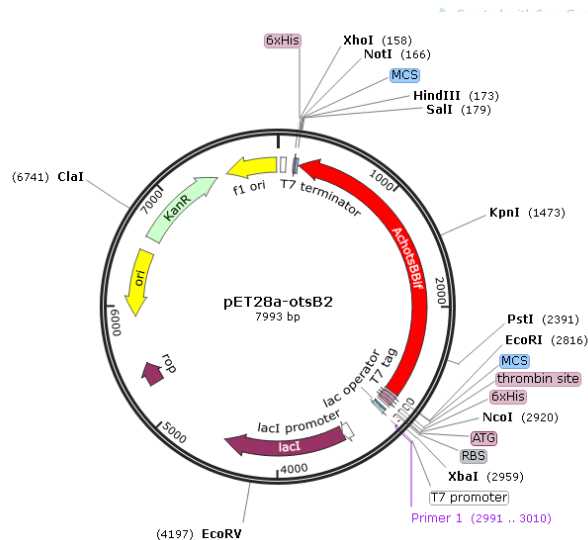


Figura 16. Vector de expresión pET28a(+) para *E. coli*; presenta un gen de resistencia a kanamicina, también contiene un operador regulado por IPTG y una etiqueta de 6 histidinas en el extremo 5' del inserto.

- pDEST32

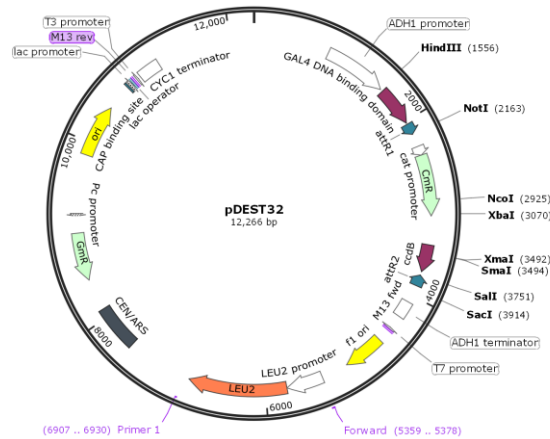


Figura 17. Vector de expresión pDEST32. Empleado como molde para amplificar el marcador molecular *LEU2*.

8.2. Medios de cultivo

Se cultivó a *S. cerevisiae* a temperatura ambiente en medio YPD (*Yeast extract-Peptide-Dextrose*) el cual contiene: 1% extracto de levadura, 2% bacto-peptona, 2% dextrosa y 2% agar (para medio sólido), durante 3 días.

También se utilizó para levadura el medio mínimo SD-Dex (*Synthetic Dextrose*), compuesto por: 7 g/l *Yeast Nitrogen Base* (w/o aminoacids), 2% Dextrosa, 2% agar y 100 ml/l de buffer MES (stock 0.5 M); suplementado con 30 mg/l uracilo, 30 mg/l histidina, 30 mg/l triptófano, 100 mg/l leucina y 30 mg/l adenina. Para levaduras mutantes $\Delta T P S 2$ no se agregó leucina al medio para seleccionarlas, además, para el cultivo de células transformadas con pSAL4 se omitió añadir uracilo, ya que el plásmido restablece la auxotrofia.

Para los cultivos de *E. coli* se utilizó medio LB (Luria-Bertani), preparado con: 10 g/l peptona de caseína, 5 g/l extracto de levadura y 5g/l NaCl. Los cuales fueron incubados a 37°C en agitación constante a 200 rpm.

8.3. Alineamientos de secuencias peptídicas de OtsB2

Con la finalidad de encontrar residuos específicos de OtsB2 que estén involucrados en su actividad catalítica, se realizó un alineamiento de secuencias para comparar esta enzima con otras proteínas OtsB que han sido previamente descritas; para esto, nos basamos en los resultados obtenidos por Li *et al.* (2012) y las caracterizaciones de Shan y colaboradores en el 2016. Los alineamientos se llevaron a cabo con el servidor en línea T-COFFEE, con el análisis Expreso (<http://tcoffee.crg.cat/apps/tcoffee/do:expreso>).

Se descargaron de GenBank y PDB las secuencias aminoacídicas de enzimas OtsB de 4 organismos distintos: *Thermoplasma acidophilum* (GenBank: CAC12334.1), *Escherichia coli* (GenBank: 946406), *Arthrobacter alpinus* A3 (GenBank: HQ699622) y *Mycobacterium tuberculosis* (PDB: Rv3372).

8.4. Análisis del dominio glicosil hidrolasa 15 de OtsB2

Para determinar la similitud del dominio glicosil hidrolasa 15 de OtsB2 con otros miembros de esta misma familia (GH15), se descargaron dos secuencias aminoacídicas de enzimas que presentan cada tipo de actividad, es decir, glucoamilasas (GA), glucodextranasas (GDE) y trehalasas (TreH), que han sido caracterizadas; de este modo, fueron utilizadas las secuencias de *Clostridium* sp. GA (UniProt: P29761), *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* GA (PDB: 1LF6), *Arthrobacter globiformis* 12137 GDE (GenBank: BAB20416.1), *Arthrobacter globiformis* 1665 GDE (UniProt: P70745), *Thermoplasma volcanium* TreH (UniProt: Q978S7) y *Mycobacterium smegmatis* TreH (UniProt: A0R0W9).

Posteriormente se les realizó un BLAST con la base de datos en línea del NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Asimismo, se llevaron a cabo alineamientos de estas secuencias con OtsB2 para identificar los cinco motivos que constituyen el sitio activo; se utilizó de igual forma el servidor T-COFFEE, con el análisis Expreso.

8.5. Construcción de mutantes $\Delta TPS2$ en *Saccharomyces cerevisiae*

8.5.1. Preparación de células competentes

Para la obtención levaduras mutantes $\Delta TPS2$, se prepararon células competentes de *S. cerevisiae* W303-1A según el protocolo de van Leeuwen *et al.* (2015).

8.5.2. Diseño de oligonucleótidos

Se construyeron mutantes $\Delta TPS2$ de *S. cerevisiae* W303-1A siguiendo el método de Baudin *et al.* (1993); para esto, se diseñaron oligonucleótidos específicos (*forward* y *reverse*) de 20 pares de bases que permitieron la amplificación del marcador molecular *LEU2*, a partir del plásmido pDEST32. Además, con base en el genoma de *S. cerevisiae* depositada en *Saccharomyces* Genome Database (número de acceso: S000002481), en los extremos 5' de ambos *primers* se agregó una secuencia de 40 pb homóloga a las regiones flanqueantes 5' y 3' fuera de la secuencia *TPS2* (Tabla 3); el cebador *forward* lleva una región homóloga a el extremo 5' fuera de *TPS2*, mientras que el *reverse* posee una secuencia que corresponda al extremo 3' flanqueante (Figura 18).

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para amplificar el marcador *LEU2*; subrayada se encuentra la región homóloga de sitios que bordean a *TPS2*.

Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')	Longitud (bases)	TM
<i>LEU2</i> Forward	<u>AAAACCAAATAACA</u>	60	55°C
	<u>CTGCCTGTCACTATTT</u>		
	<u>CTGTGCCGAAACTGTG</u>		
	GGAATACTCAGGT		
<i>LEU2</i> Reverse	<u>TGTCTGTCTAGTCATA</u>	64	54°C
	<u>ACCATTTTCGTTAAAAA</u>		
	<u>GGGTGTTTCGTGTCGT</u>		
	TTCTATTATGAATTTC		

8.5.3. Amplificación del marcador *LEU2*

A través de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se amplificó el marcador molecular *LEU2* y el producto contuvo dicho gen, bordeado en los extremos 5' y 3' de dos secuencias de 40 pb homólogas a regiones fuera de *TPS2* (Figura 18). La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 20 μ l, la cual contaba con: 2 μ l buffer (NH₄)₂SO₄ 10X, 2 μ l dNTPs 2mM, 0.5 μ l de cada oligonucleótido 20 pmol/ μ l, 1 μ l DNA molde (100 ng/ μ l), 1.2 μ l MgCl₂ 25mM, 0.2 μ l *Taq* DNA polimerasa 5U/ μ l y 12.6 μ l H₂O mQ.

La amplificación se realizó en un termociclador con un paso inicial de 1 ciclo de desnaturalización a 98°C por 60 segundos, luego, 30 ciclos de: 10 segundos a 98°C, 20 segundos a 55°C y 90 segundos a 72°C. Por último, 1 ciclo a 72°C por 5 minutos; al finalizar, el producto se verificó en un gel de agarosa al 1%.

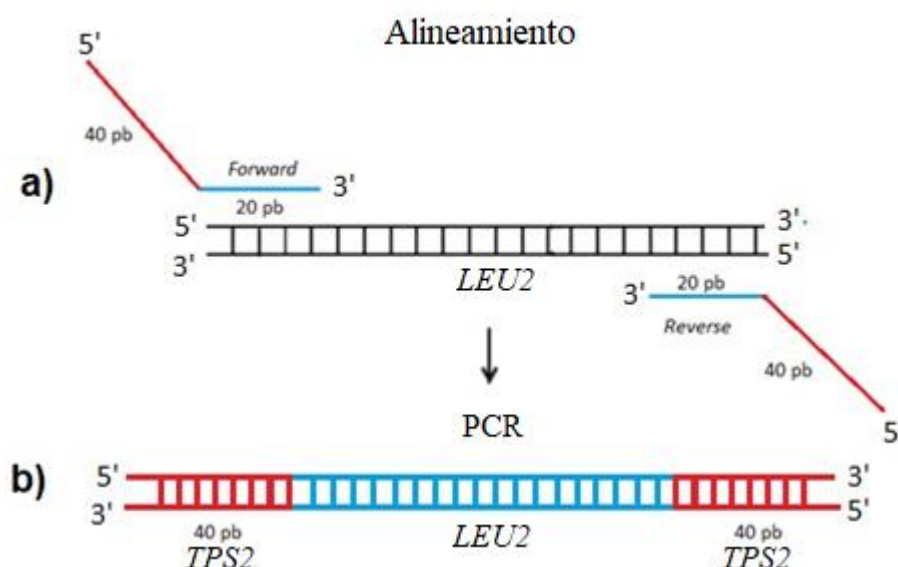


Figura 18. Diseño de oligonucleótidos y amplificación del marcador molecular. **a)** Esquema de los primers; de color azul se muestra la región que hibrida con el DNA molde (*LEU2*) y permitió la amplificación. De color rojo es señalada la secuencia añadida al primer que es homóloga a regiones fuera de *TPS2* y no hibrida con el marcador molecular. **b)** El producto de PCR contuvo entonces el casete para la síntesis de leucina y dos regiones flanqueantes homólogas a zonas fuera de *TPS2* en el genoma de *S. cerevisiae*.

8.5.4. Transformación en *S. cerevisiae* y delección de *TPS2*

El producto de PCR se purificó del gel de agarosa con el kit Qiaex II *Gel Extraction* siguiendo las instrucciones del fabricante, posteriormente, el DNA fue introducido en levaduras competentes, según el protocolo de van Leeuwen *et al.* (2015). Se llevó a cabo resuspendiendo 12 µl de células en 100 µl de Buffer de Transformación (para 1050 µl: 800 µl de PEG3350 al 50%, 100 µl de LiAc 1 M, 100 µl TE 10X y 50 µl DMSO). Posteriormente, se añadieron aproximadamente 100 ng del DNA amplificado; también se utilizó un acarreador de cadena sencilla (ssDNA), para este caso se usó DNA de esperma de salmón previamente calentado hasta ebullición, del cual también se agregaron ~100 ng. Se prosiguió incubando a temperatura ambiente durante 30 minutos, luego se incubó a 42°C por 15 minutos, por último, se colocó en hielo por 5 minutos. Durante este tiempo, dentro de las células se efectuó una recombinación homóloga entre el DNA introducido y regiones flanqueantes de *TPS2*; de este modo se retiró el gen *TPS2* y se insertó *LEU2*, el cual nos sirvió como marcador molecular para distinguir a levaduras mutantes.

Al terminar, se colectaron las células centrifugándolas a 3000 rpm por 2 minutos; se resuspendieron en 1 ml de medio YPD y se plaquearon 250 µl en medio sólido SD-Dex sin leucina (Leu⁻). Los sitios que flanquean el marcador molecular *LEU2* permitieron el intercambio de cadenas con regiones que bordean el gen *TPS2*; de esta forma se efectuó la mutación y la integración del casete para una selección de levaduras mutantes (Figura 19).

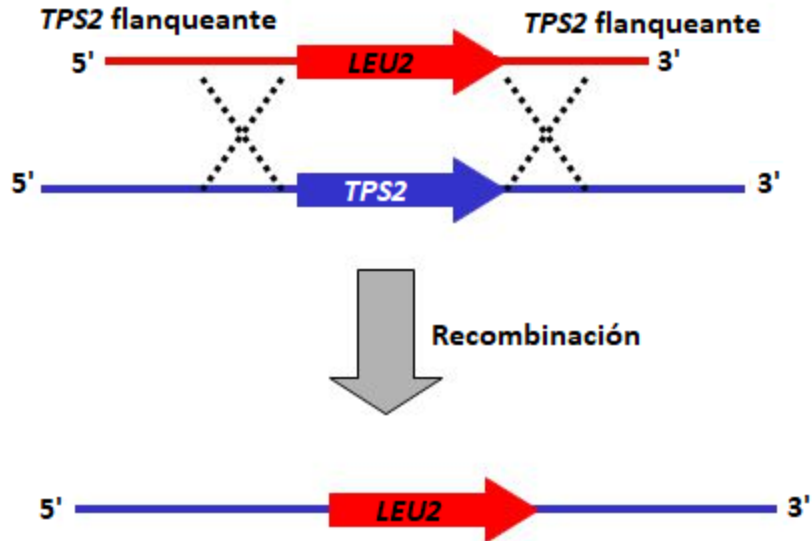


Figura 19. Delección de *TPS2* por recombinación homóloga. De color rojo se muestra el producto de PCR introducido en *S. cerevisiae*; en azul, se indica el DNA genómico de la levadura. Posterior al evento de recombinación, se observa como sustituye el marcador de leucina (*LEU2*) al gen *TPS2* en el genoma de la levadura.

8.5.5. Selección de las mutantes de levadura

Las levaduras que lograron crecer en medio SD-Dex sin leucina (Leu^-), por medio de la recombinación, posiblemente integraron el marcador molecular *LEU2* en su genoma, quitando el gen *TPS2*. De este modo, las colonias presentes fueron sembradas nuevamente en medio SD-Dex (Leu^-) para posteriormente corroborar tal mutación.

8.6. Confirmación de levaduras mutantes

8.6.1. Evaluación fenotípica de *S. cerevisiae* $\Delta TPS2$

Aprovechando el efecto pleiotrópico resultante de una delección en *TPS2*, en el cual la levadura se torna incapaz de crecer a 39°C (termosensible), las colonias transformantes se sembraron en medio YPD y SD-Dex (Leu^-) a dicha temperatura, utilizando la cepa W303-1A (WT) como control; se incubaron durante 3 días. Las colonias que fueron incapaces de crecer a esta temperatura se seleccionaron para corroborar la mutación de *TPS2* por medio de PCR.

8.6.2. Corroboración de mutantes por PCR

Con el fin de comprobar si las levaduras con el fenotipo termosensible poseen la delección en *TPS2*, se hizo una amplificación por PCR, para esto, se purificó DNA genómico de las colonias seleccionadas anteriormente, siguiendo el método de Boeke *et al.* (1985) con algunas variaciones.

Se cultivaron levaduras en 5 ml de medio YPD y se dejaron crecer *overnight*; posteriormente, las células fueron colectadas por centrifugación a 14,000 rpm por 3 minutos y se lavaron con una solución 1 M sorbitol/100 mM EDTA (pH: 7.5). A continuación, se resuspendieron las levaduras en 400 µl de esta misma solución y se agregaron 10 µl de liticasa (100 mg/ml) y se incubaron a 37°C *overnight*; los esferoplastos se recuperaron por centrifugación y se resuspendieron en 500 µl de buffer TE (10 mM Tris-HCl, pH:7.5; 1 mM EDTA). Consecutivamente, fueron lisados los esferoplastos agregando 90 µl de solución de lisis (250 mM EDTA, pH:8, 0.4 M Tris base, 2% SDS) y se incubaron 30 minutos a 60°C; subsiguientemente, se añadieron 80 µl de acetato de potasio 5 M y la mezcla se colocó en hielo durante 60 minutos. El precipitado se removió centrifugando 15 minutos a 15,000 rpm a 4°C y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo. Se prosiguió a añadir 400 µl de PCI (fenol-cloroformo-isoamílico 25:24:1); se centrifugó 3 minutos a 14,000 rpm y se tomó la fase acuosa para colocarla en otro tubo; este sobrenadante se le adicionó isopropanol y se mezcló por inversión varias veces para precipitar los ácidos nucleicos. Se retiró el isopropanol y se agregaron 400 µl de etanol 70%, se agitó con vortex y de igual forma se retiró todo el etanol. La pastilla de ácidos nucleicos se dejó secar por completo y fue resuspendido en 50 µl de TE-RNAsa (60 µg/ml).

Se diseñaron oligonucleótidos específicos de 20 pb que permitieron amplificar la región donde se llevó a cabo la mutación (Tabla 4); los *primers* hibridaron a 41 pb y 113 pb (*forward* y *reverse* respectivamente) del sitio donde se realizó la recombinación. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 25 µl, componiéndose de: 2.5 µl buffer KCl 10X, 2.5 µl dNTPs 2mM, 1 µl de cada oligonucleótido 20 pmol/ µl, 1 µl DNA molde (100 ng/µl), 1.5 µl MgCl₂ 25mM, 1 µl Taq DNA polimerasa 1U/µl y 14.5 µl H₂O mQ.

Las condiciones para la amplificación fueron: 1 ciclo de desnaturalización a 98°C por 1 minuto, luego, 35 ciclos con un programa de 20 s a 98°C, 20 s a 59°C y 3 minutos a 72°C; para terminar, un ciclo de elongación de 5 minutos a 72°C. Posteriormente, el producto de PCR se

verificó por electroforesis en gel de agarosa al 1% (buffer TAE). El patrón de bandas nos indicó si la mutación se realizó de forma correcta, es decir, se observaron bandas correspondientes a *LEU2* de 1806 pb ó *TPS2*, de 2925 pb.

Tabla 4. Oligonucleótidos diseñados para la verificación de mutantes.

Oligonucleótido	Secuencia (5'- 3')	Longitud (bases)	TM
<i>TPS2</i> Forward	ATA GCT ACC AAC GTA CCC AG	20	55°C
<i>TPS2</i> Reverse	CGA AAA TGG TGG GTT GAG AC	20	56°C

8.7. Expresión de *otsB2* en *S. cerevisiae* Δ *TPS2*

8.7.1. Transformación de *S. cerevisiae* Δ *TPS2* con construcciones

Se utilizó el método de van Leeuwen *et al.* (2015) previamente descrito, para introducir el vector de expresión pSAL4 (con cada una de las construcciones) en *S. cerevisiae* Δ *TPS2*. Además, se empleó este mismo plásmido como control (pSAL4 sin inserto), es decir, también se introdujo en las levaduras mutantes. Cabe resaltar que los vectores fueron analizados por digestión enzimática antes de transformar las levaduras.

Se resuspendieron 12 μ l de células en 100 μ l de buffer de Transformación (para 1050 μ l: 800 μ l de PEG3350 al 50%, 100 μ l de LiAc 1 M, 100 μ l TE 10X y 50 μ l DMSO), aproximadamente 100 ng de ssDNA de esperma de salmón (acarreador) y 1 μ l de plásmido pSAL4 con la respectiva construcción (se repitió el procedimiento para introducir el vector con cada una de las tres construcciones). Al igual que la transformación anterior, se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos, luego a 42°C por 15 minutos, por último, se colocó en hielo por 5 minutos. Las células se colectaron centrifugando a 3000 rpm durante 1 minuto, posteriormente, se resuspendieron en 1 ml de medio YPD y fueron sembrados 250 μ l en medio sólido SD-Dex sin leucina y uracilo (Leu⁻, Ura⁻).

8.7.2. Verificación de las construcciones por PCR

Asimismo, se comprobó mediante PCR que *S. cerevisiae* haya obtenido el plásmido correspondiente; para esto, se utilizaron los *primers* y cada una de las condiciones siguientes:

- pSAL4-*otsB2* y pSAL4-*otsB2*ΔGH15

Tabla 5. *Primers* para amplificar *otsB2* y *otsB2*ΔGH15

Oligonucleótido	Secuencia (5' - 3')	Longitud (bases)	TM
Forward	ATG CCC ACG CCT TTG AAC CA	20	60°C
Reverse	CTA CCG TCC GGC CTG GTG CG	20	60°C

Un ciclo de desnaturalización a 95°C por 3 minutos, posteriormente, 35 ciclos de 1 minuto a 95°C, 3 minutos a 64°C y 2:30 minutos a 72°C; por último, un ciclo final de elongación a 72°C durante 5 minutos.

- pSAL4-*TPS/TPP*

Tabla 6. Cebadores para la amplificación de *TPS/TPP*.

Oligonucleótido	Secuencia (5' - 3')	Longitud (bases)	Tm
Forward	5'GCT AAA TCT ATT AAC ATG G3'	19	58°C
Reverse	5'GGT ACC ATG GTG GGT TGA GAC3'	21	58°C

La PCR se realizó con un paso inicial de 5 minutos a 95°C, posteriormente, 35 ciclos de: 45 segundos a 95°C, 62°C por 45 segundos y 1:30 minutos a 72°C. Al finalizar, se hizo 1 ciclo de 72°C por 5 minutos.

8.7.3. Ensayo de complementación

Una vez teniendo las levaduras mutantes albergando cada una de las construcciones, fueron sembradas en medio YPD y SD-Dex (Leu⁻, Ura⁻) suplementado con 100 μ M de CuSO₄; ambas cajas fueron divididas en 6 partes, correspondiendo cada sección a la cepa WT (W303-1A), *S. cerevisiae* Δ TPS2 colonia 6 sin vector y las levaduras con los plásmidos: las cajas fueron incubadas a 39°C durante tres días para verificar si la expresión de *otsB2* restablece el fenotipo silvestre (termotolerante).

8.8. Expresión de *otsB2* en *E. coli*

Para expresar la enzima OtsB2 de *P. chlorophenolicus* Mor30.16 se utilizaron las cepas BL21 DE3 y SHuffle de *E. coli* (quimiocompetentes). Este organismo fue transformado según protocolos estándares con el plásmido pET28a(+) que cuenta con la construcción de *otsB2*. Una vez concluido el proceso de transformación, fue sembrado en medio sólido LB adicionado con 50 μ g/ml de kanamicina. Posteriormente, con estas transformantes, se realizó un preinóculo de 5 ml LB-Km 50 μ g/ml, dejando crecer *overnight* en agitación (200 rpm) a 37°C.

Subsiguientemente, para la obtención de la proteína recombinante, 1 ml de este preinóculo se pasó a un matraz de 250 ml con 50 ml LB suplementado con kanamicina y se dejó en las mismas condiciones hasta llegar a una densidad óptica de 0.6 (medición a 600 nm). En seguida, se adicionó IPTG con una concentración final de 1 mM y se dejó en agitación durante 4 horas. Se repitió este procedimiento sin agregar IPTG para el control negativo.

9. RESULTADOS

9.1. Obtención de levaduras mutantes $\Delta TPS2$

Se amplificó el marcador molecular *LEU2*, este amplicón de 1652 pb contiene en los extremos 5' y 3' secuencias homólogas a regiones flanqueantes de *TPS2* (Figura 20 a). Posteriormente, se realizó la digestión del producto de PCR con la enzima *EcoRI* para confirmar que se trataba de la secuencia *LEU2*, esperando obtener una banda de 567 pb y otra de 1085 pb (Figura 20 b).

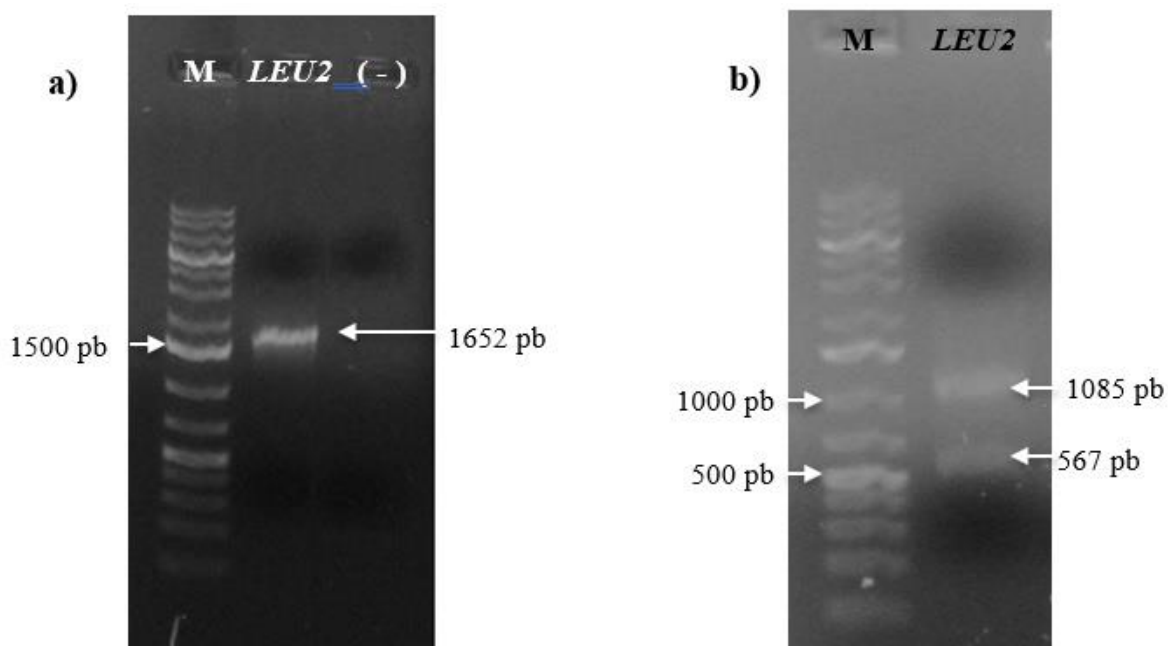


Figura 20. a) Amplificación de *LEU2*; el primer carril atañe al marcador de peso molecular GeneRuler 1Kb plus de Thermo Scientific™. El segundo carril corresponde al producto de PCR, mientras que el tercero es el control negativo (reacción sin DNA molde). b) Digestión de *LEU2* con *EcoRI*, en el segundo carril se muestran dos fragmentos de los tamaños esperados con base en su mapa (1085 pb y 567 pb).

Consecutivamente, *LEU2* fue purificado directamente del gel de agarosa y se introdujo en *S. cerevisiae* W303-1A para llevar a cabo la delección de *TPS2*; un total de nueve colonias (numeradas del 1 al 9 respectivamente) crecieron en el medio SD-Dex (Leu⁻) dos días después de haber realizado la transformación. Asimismo, fueron sembradas en cajas individuales para almacenarlas y posteriormente corroborar dicha mutación.

9.2. Confirmación de levaduras mutantes

Para determinar si las colonias transformantes poseían la mutación en *TPS2*, primeramente, se hizo una exclusión de aquellas que no presentaban el fenotipo termosensible, es decir, fueron sembradas e incubadas a 39°C (Figura 21; Figura 23).

Las levaduras que crecieron se descartaron inmediatamente (colonias **3**, **4**, **5**, **7** y **8**), por otro lado, aquellas que exhibían el fenotipo correcto de la mutación, se purificó su DNA para verificarlas por medio de PCR (colonias **1**, **2**, **6** y **9**) (Figura 22). Con esto, se pudo identificar realmente a las levaduras mutantes, ya que la amplificación debe corresponder a 1806 pb, el tamaño de la secuencia de *LEU2* que fue integrado en el genoma en lugar de *TPS2*. El producto de PCR reveló que únicamente las colonias **1** y **6** poseían dicha mutación.

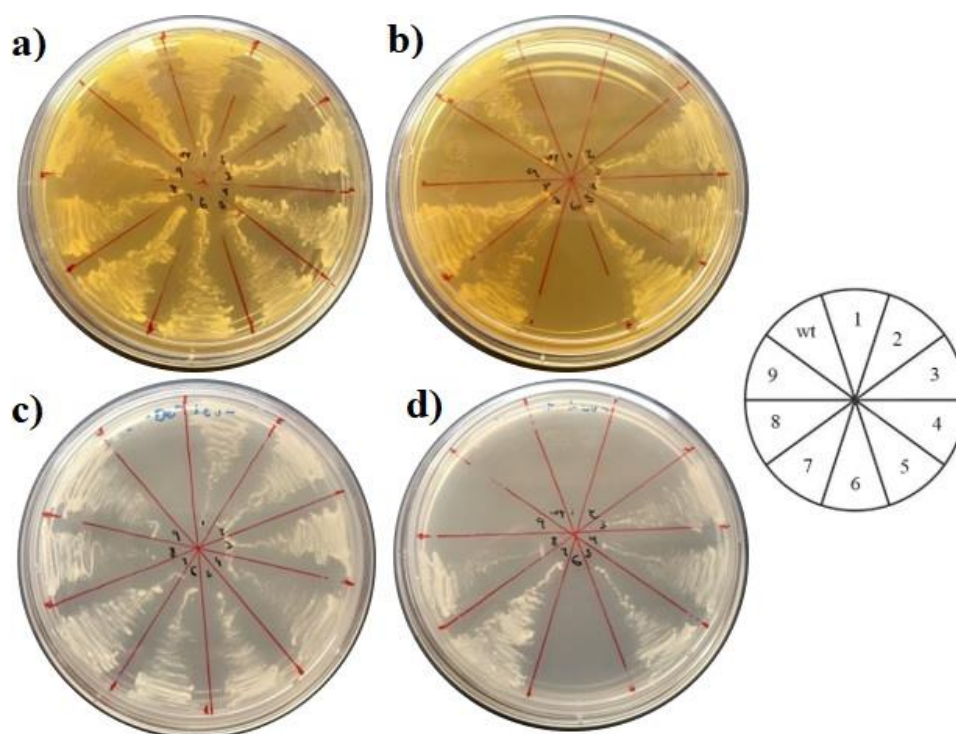


Figura 21. Ensayo de termosensibilidad; las 9 colonias transformantes fueron sembradas en medio YPD (a), posteriormente se transfirieron al medio SD-Dex (Leu-), verificando que puedan crecer sin leucina ya que se integró *LEU2* en su genoma, excepto la WT (c). Se puede observar que las colonias **1**, **2**, **6** y **9** presentan el fenotipo termosensible de la mutación en *TPS2*, ya que no crecen a 39°C (b y d).

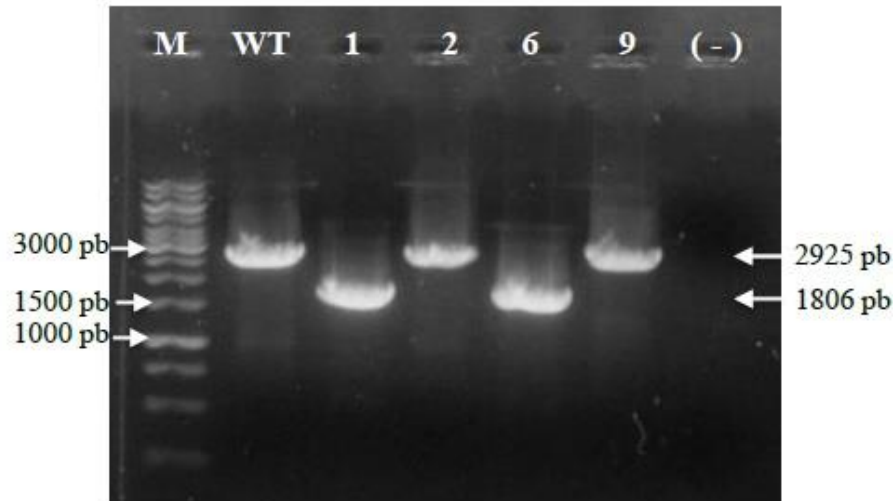


Figura 22. Confirmación de mutantes $\Delta TPS2$ por PCR; los fragmentos de 2925 pb conciernen a *TPS2* (WT). Se observa que las colonias **2** y **9** no tienen la mutación, sin embargo, las colonias **1** y **6** son mutantes positivas ya que el tamaño de las bandas corresponde a *LEU2* (1806 pb).

Por último, se volvió a verificar la termosensibilidad de las colonias **1** y **6** a 39°C para tener certeza que no crecen a esta temperatura antes de seleccionar alguna para transformarla con los vectores que contienen las construcciones de *otsB2*; en este caso y de forma arbitraria, para realizar los ensayos de complementación fue seleccionada la colonia **6**.

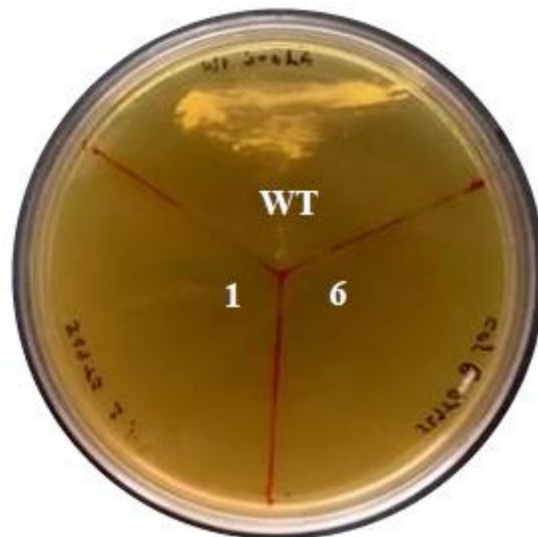


Figura 23. Repetición de la evaluación del fenotipo termosensible con las colonias que poseen la mutación en *TPS2*; únicamente la WT presentó crecimiento a 39°C, mientras que las mutantes (colonias **1** y **6**) no lo hicieron.

9.3. Análisis de plásmidos

Previamente de introducir las construcciones pSAL4, pSAL4-*otsB2*, pSAL4-*otsB2*ΔGH15 y pSAL4-*TPS/TPP* (Figura 24) en *S. cerevisiae* Δ*TPS2*, se verificaron por medio de digestión enzimática. De esta forma, nos cercioramos mediante el patrón de bandas que se trata de los plásmidos correctos.

Para pSAL4-*otsB2* las bandas a observarse eran de 2637 pb y 6098 pb, asimismo, para pSAL4-*otsB2*ΔGH15 las bandas debían corresponder a 2636 pb y 6098 pb; estos vectores fueron digeridos con *EcoRI* y *SalI*. Por otro lado, los fragmentos de pSAL4-*TPS/TPP* fueron 2871 pb y 6082 pb, cortes realizados con *XhoI* y *KpnI*; por último, para el vector pSAL4 se esperaban los tamaños de 860 pb y 5287 pb cuya digestión fue realizada con *BamHI* y *HindIII* (Figura 25).

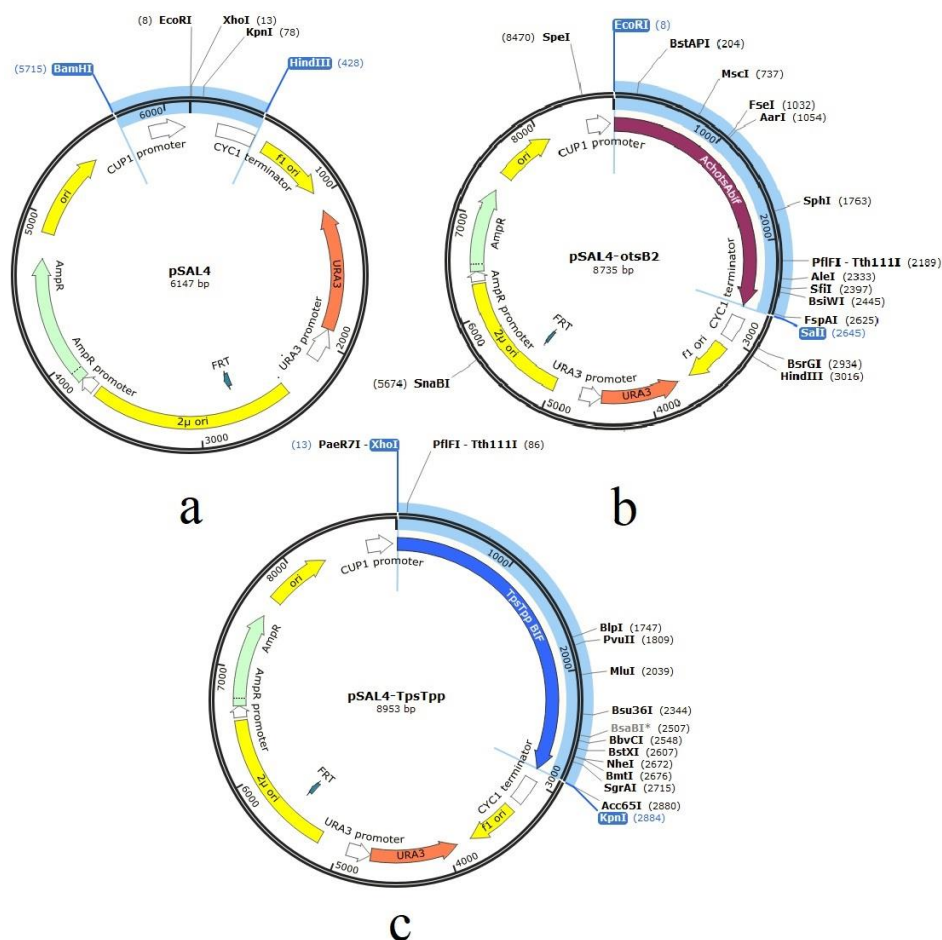


Figura 24. Construcciones para ensayo de complementación; **a)** Vector pSAL4 (6147 pb). **b)** pSAL4-*otsB2* (8735 pb; 8734 pb para pSAL4-*otsB2*ΔGH15 por la deleción en un nucleótido). **c)** pSAL4-*TPS/TPP* (8953 pb). Mapas realizados con el programa SnapGene®.

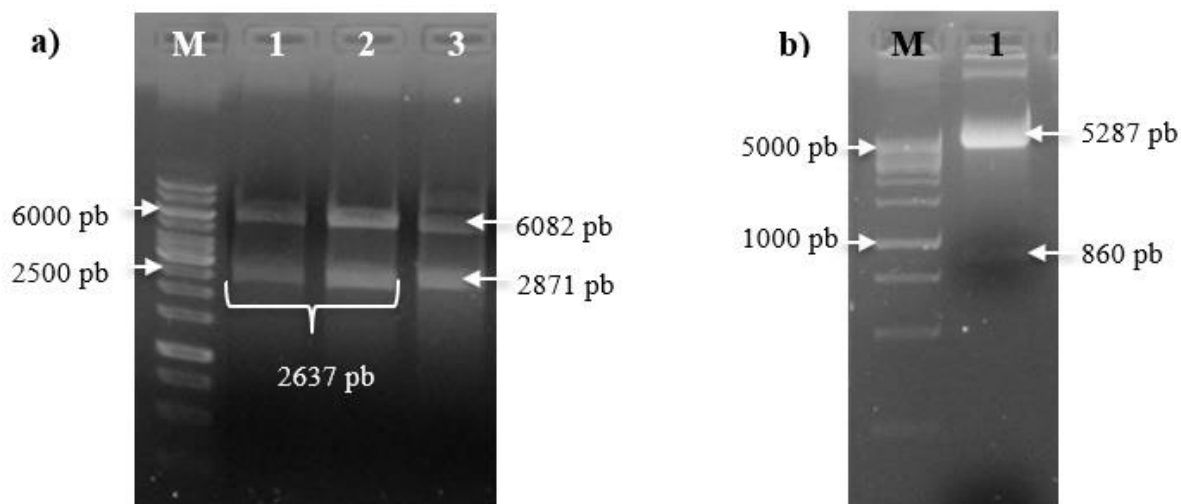


Figura 25. Análisis de restricción de plásmidos; **a)** Los carriles 1 y 2 pertenecen a pSAL4-*otsB2* y pSAL4-*otsB2*ΔGH15 (respectivamente) cortados con *EcoRI* y *Sall*, mientras que en el carril 3 se observa al vector pSAL4-TPS/TPP digerido con *XhoI* y *KpnI*. **b)** En el carril 1 se observa el corte del plásmido pSAL4 utilizando *BamHI* y *HindIII*.

9.4. Transformación de *S. cerevisiae* ΔTPS2 con vectores de complementación

Una vez verificados los vectores, se procedió a introducirlos en *S. cerevisiae* ΔTPS2 utilizando la colonia **6** (mutante confirmada) como célula hospedera de los plásmidos; en total se realizaron cuatro transformaciones, una por cada construcción. Las levaduras transformantes fueron sembradas en medio SD-Dex (Leu⁻, Ura⁻) para hacer una selección con ambos marcadores, el del vector y la mutación.

Posteriormente, se tomó una colonia de cada transformación para comprobar si las levaduras ΔTPS2 poseían el plásmido con la construcción correcta; se purificó el DNA genómico de estas células y se amplificaron cada una de las secuencias de los insertos en los vectores, es decir, los genes *otsB2*, *otsB2*ΔGH15 y *TPS/TPP* (Figura 26); después, con esa misma muestra de DNA, se transformó a *E. coli* DH5α para volver a aislar los plásmidos y con esto, corroborar que efectivamente se encontraban dentro de las levaduras. Los vectores purificados de *E. coli* fueron digeridos con enzimas de restricción (Figura 27). Cabe resaltar que para las digestiones de los plásmidos que contaban con estos insertos, se realizaron con las mismas enzimas de restricción mencionadas anteriormente; solamente el corte de pSAL4 (sin construcción) fue diferente, utilizando *HindIII* y *EcoRI*.

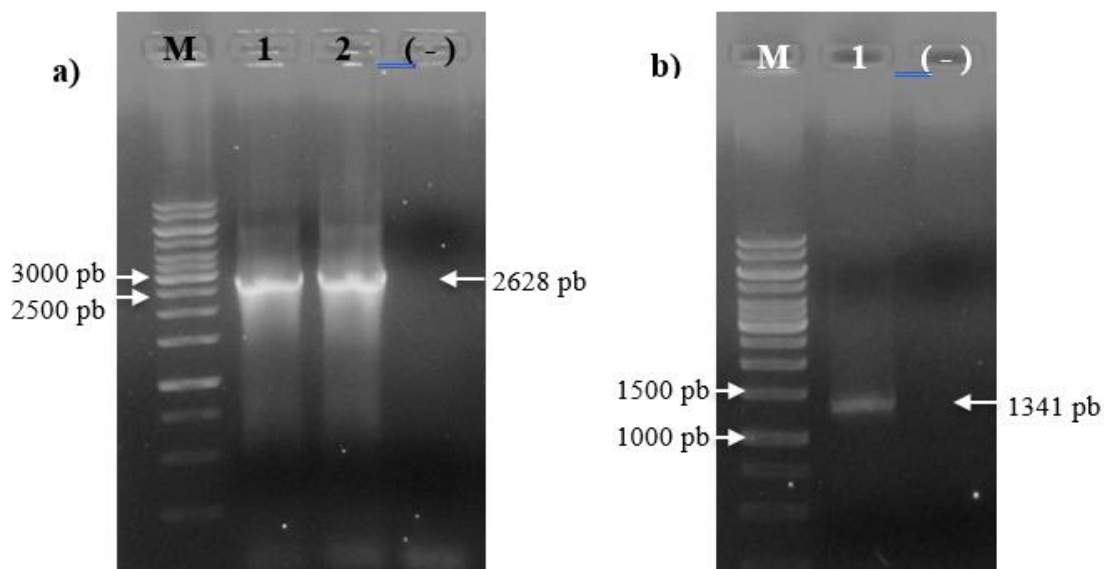


Figura 26. Amplificación de construcciones presentes en el DNA genómico *S. cerevisiae* $\Delta TPS2$; **a)** las bandas de 2628 pb corresponden a *otsB2* y *otsB2* $\Delta GH15$ (carriles 1 y 2 respectivamente). **b)** En el carril 1 se encuentra el producto de PCR de 1341 pb, que equivale a una región de la construcción de pSAL4-*TPS/TPP*; no se realizó amplificación de pSAL4 (sin inserto) ya que se tomó de un *stock* del proveedor.

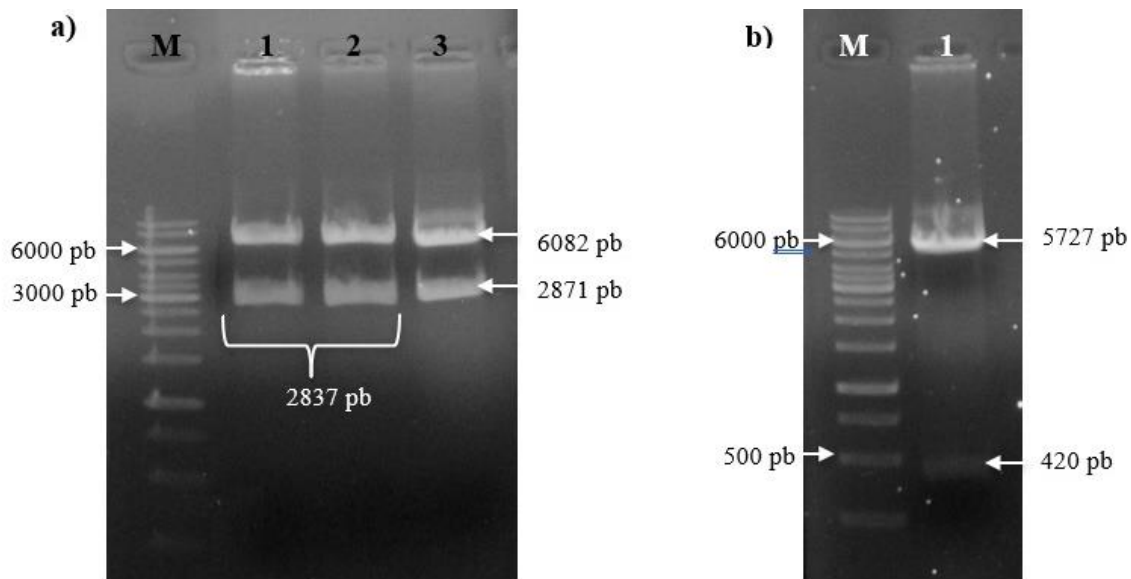


Figura 27. Digestión de plásmidos aislados de *E. coli*; **a)** se observan en el carril 1 la digestión de pSAL4-*otsB2* y en el segundo, la restricción de pSAL4-*otsB2GH15*, ambas cortadas con *EcoRI* y *SalI*. Por otro lado, en el carril 3 se muestra a pSAL4-*TPS/TPP* cortado con *XhoI* y *KpnI*. **b)** El carril 1 concierne al vector pSAL4 digerido con *HindIII* y *EcoRI*.

Además, con el DNA genómico de las levaduras transformantes también se verificó nuevamente por PCR que fueran mutantes $\Delta TPS2$ para poder realizar los ensayos de complementación; las bandas de 2925 pb corresponden al fenotipo WT (secuencia *TPS2*), mientras que un tamaño de 1806 pb atañe a *S. cerevisiae* mutante (*LEU2*). El producto de las amplificaciones evidenció que todas las levaduras que albergaban cada uno de los plásmidos poseían la mutación, asimismo, también se verificó la cepa control WT (W303-1A) y la colonia **6** sin vector (Figura 28).

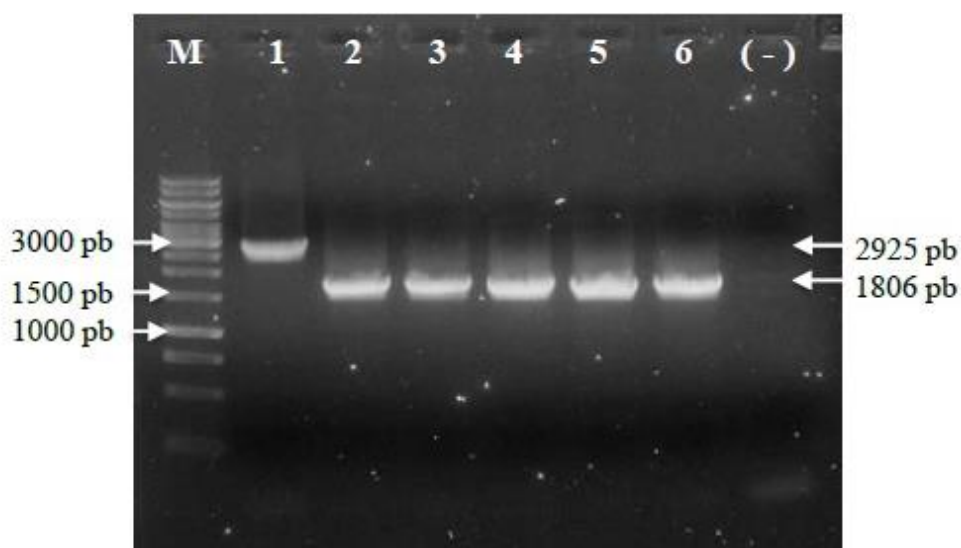


Figura 28. Levaduras mutantes y WT para el ensayo de complementación; en el carril 1 se muestra a la cepa W303-1A (WT). El segundo carril corresponde a la colonia **6** (mutante $\Delta TPS2$ sin plásmido), mientras que los carriles 3, 4, 5 y 6 pertenecen a las levaduras $\Delta TPS2$ transformadas con las construcciones pSAL4-*otsB2*, pSAL4-*otsB2* Δ GH15, pSAL4-*TPS/TPP* y pSAL4 (respectivamente).

9.5. Ensayos de complementación en *S. cerevisiae* $\Delta TPS2$

Las levaduras mutantes transformadas con los plásmidos de complementación fueron sembradas en una caja de medio YPD y SD-Dex (Leu^- , Ura^-) suplementado con 100 μ M de $CuSO_4$, posteriormente, se incubaron a 39°C durante 3 días para comprobar si la expresión de *otsB2* restablece el fenotipo WT, es decir, si la célula se torna termotolerante. Este ensayo reveló que la expresión de *otsB2* no complementa a *S. cerevisiae* $\Delta TPS2$, ya que no fue capaz de crecer a tal temperatura; únicamente los controles positivos (WT y *S. cerevisiae* $\Delta TPS2$ pSAL4-*TPS/TPP*) mostraron crecimiento (Figura 29).

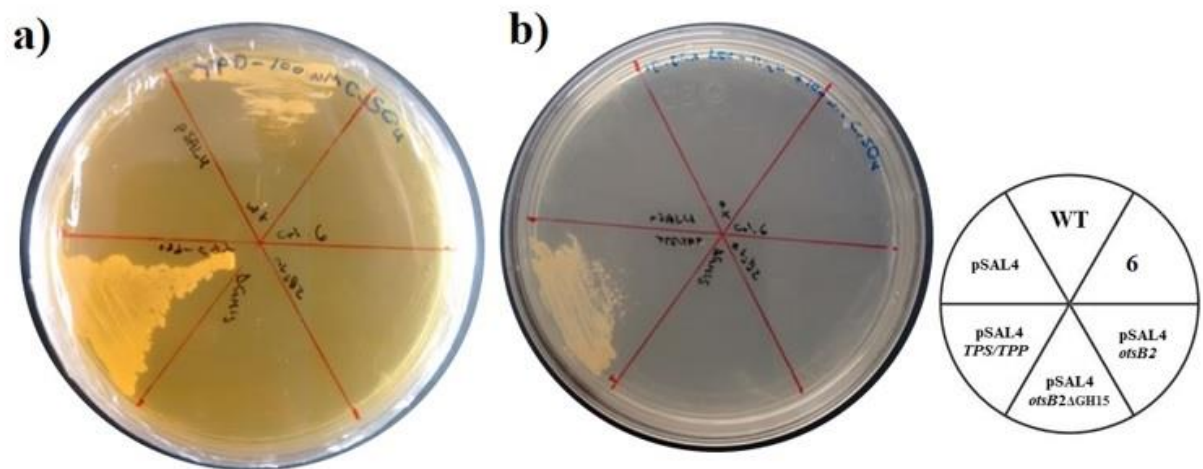


Figura 29. Ensayos de complementación a 39°C; la expresión de *otsB2* en *S. cerevisiae* Δ *TPS2* no hace que recupere el fenotipo silvestre. **a)** Experimento realizado en medio YPD, solamente crecieron *S. cerevisiae* WT (W303-1A) y la levadura mutante Δ *TPS2* que alberga la construcción pSAL4-*TPS/TPP* (controles +). **b)** Ensayo realizado en medio SD-Dex (Leu-, Ura-), únicamente presentó crecimiento *S. cerevisiae* Δ *TPS2* con el vector pSAL4-*TPS/TPP*.

9.6. Alineamiento de secuencias de OtsB

Con base en las secuencias aminoacídicas de enzimas OtsB depositadas en GenBank y PDB, se determinaron residuos estructuralmente importantes para llevar a cabo su función. Esto nos permitió dilucidar que OtsB2 de *P. chlorophenolicus* posee los 3 *motifs* característicos de los miembros de la superfamilia HAD; en conjunto, estas tres regiones conforman el sitio catalítico de la enzima. Particularmente se ha visto que 4 residuos de ácido aspártico localizados en los motivos I y III, juegan un papel clave para realizar su actividad catalítica. Sin embargo, se puede observar que OtsB2 no cuenta con los aspartatos del motivo I (Figura 30), además, en el *motif* III tiene uno de estos residuos con una diferencia de posición en comparación con las demás secuencias (Figura 31).



Figura 30. Alineamientos de OtsB; en cuadros rojos se muestran los residuos pertenecientes al *motif* I y II de esta enzima. Los aminoácidos marcados de azul en el motivo I (dos aspartatos) forman parte del sitio activo y se ha identificado que son los involucrados para realizar la catálisis, resalta que OtsB2 de *P. chlorophenicus* no los posee. Por otro lado, en el *motif* II el residuo de serina (o treonina) se encuentra conservado en todas las enzimas.

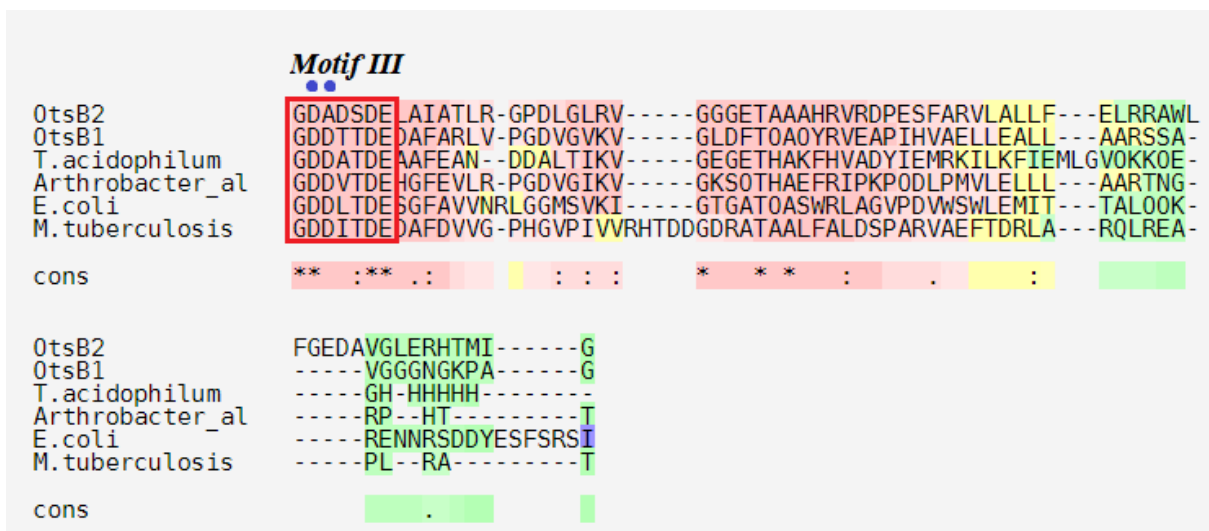


Figura 31. Alineamientos de secuencias OtsB; en un cuadro rojo se ha marcado la región que forma el *motif* III de la enzima. Adicionalmente, los aminoácidos acentuados con un punto azul (dos aspartatos) corresponden a residuos que forman parte del sitio activo. En este motivo, es notorio como todas las secuencias poseen dos residuos contiguos de ácido aspártico, empero, OtsB2 tiene uno de estos aminoácidos una posición adelante con relación en las otras secuencias.

9.7. Análisis del dominio GH15 de OtsB2

Con la finalidad de encontrar semejanzas entre el dominio glicosil hidrolasa 15 de OtsB2 y enzimas agrupadas en GH15, se realizó un BLAST con diferentes secuencias de GAs, GDEs y TreHs. El alineamiento de las secuencias señala que OtsB2 presenta mayor porcentaje de identidad con trehalasas, particularmente con la secuencia de *Thermoplasma volcanium*, obteniendo una similitud de 31.56% y un *E value* de $2e-96$.

En la tabla 7 se muestran los resultados del BLAST en el siguiente orden: **1**, Trehalasa *T. volcanium*. **2**, Trehalasa *Mycobacterium smegmatis*. **3**, Glucoamilasa de *Clostridium* sp. **4**, Glucoamilasa de *T. thermosaccharolyticum*, **5**, Glucodextranasa de *Arthrobacter globiformis* 1665 y **6**, Glucodextranasa de *A. globiformis* 12137.

Tabla 7. BLAST de OtsB2; el alineamiento más significativo se obtuvo con las enzimas trehalasas.

Secuencia	Cobertura de consulta (%)	<i>E value</i>	Porcentaje de identidad (%)
TreH ¹	98	2e-96	31.56
TreH ²	97	8e-87	33.61
GA ³	49	0.003	22.04
GA ⁴	25	0.017	27.78
GDE ⁵	7	0.42	31.71
GDE ⁶	5	2.2	34.38

Además, se realizaron los alineamientos con el programa Clustal Omega para determinar el porcentaje de identidad con las secuencias previamente utilizadas, lo cual nos ayudó a construir una matriz de doble entrada para identificar las similitudes entre todas las enzimas utilizadas; de igual forma, OtsB2 tuvo un porcentaje de identidad más significativo con las enzimas trehalasas que con otros miembros de las GH15 (Tabla 8).

Tabla 8. Porcentajes de identidad de los miembros de GH15 y OtsB2. **1**, *P. chlorophenicus* OtsB2; **2**, glucoamilasa de *Clostridium* sp; **3**, glucoamilasa de *T. thermosaccharolyticum*; **4**, glucodextranasa de *Arthrobacter globiformis* 1665, **5**, glucodextranasa de *A. globiformis* 12137; **6**, Trehalasa *M. smegmatis* y **7**, trehalasa de *T. volcanium*.

Enzimas	OtsB2 ¹	GA ²	GA ³	GDE ⁴	GDE ⁵	TreH ⁶	TreH ⁷
OtsB2 ¹	100%	15.16%	14.78%	17.13%	17.17%	33.98%	31.80%
GA ²	15.16%	100%	94.96%	39.65%	39.07%	15.99%	17.27%
GA ³	14.78%	94.96%	100%	39.76%	39.18%	16.23%	16.92%
GDE ⁴	17.13%	39.65%	39.76%	100%	79.73%	18.91%	16.30%
GDE ⁵	17.17%	39.07%	39.18%	79.73%	100%	18.43%	16.11%
TreH ⁶	33.98%	15.99%	16.23%	18.91%	18.43%	100%	30.64%
TreH ⁷	31.80%	17.27%	16.92%	16.30%	16.11%	30.64%	100%

9.7.1. Alineamiento de OtsB2 y miembros de GH15

Con el fin de comprobar si OtsB2 presenta los cinco motivos que forman el sitio activo en la familia 15 de glicosil hidrolasas, se realizaron alineamientos con las secuencias previamente utilizadas, aunado a esto, se comparó que los *motifs* identificados corresponden con aquellos reportados en la literatura. Se logró esclarecer que OtsB2 exhibe los cinco *motifs* conservados (Figuras 32, 33 y 34), además de compartir los residuos de ácido glutámico en los motivos III y V, los cuales se encuentran en todos los miembros de las GH15 (Figuras 33 y 34). Aparentemente las secuencias de los *motifs* ubicados en OtsB2 se relacionan más con aquellos presentes en enzimas trehalasas.

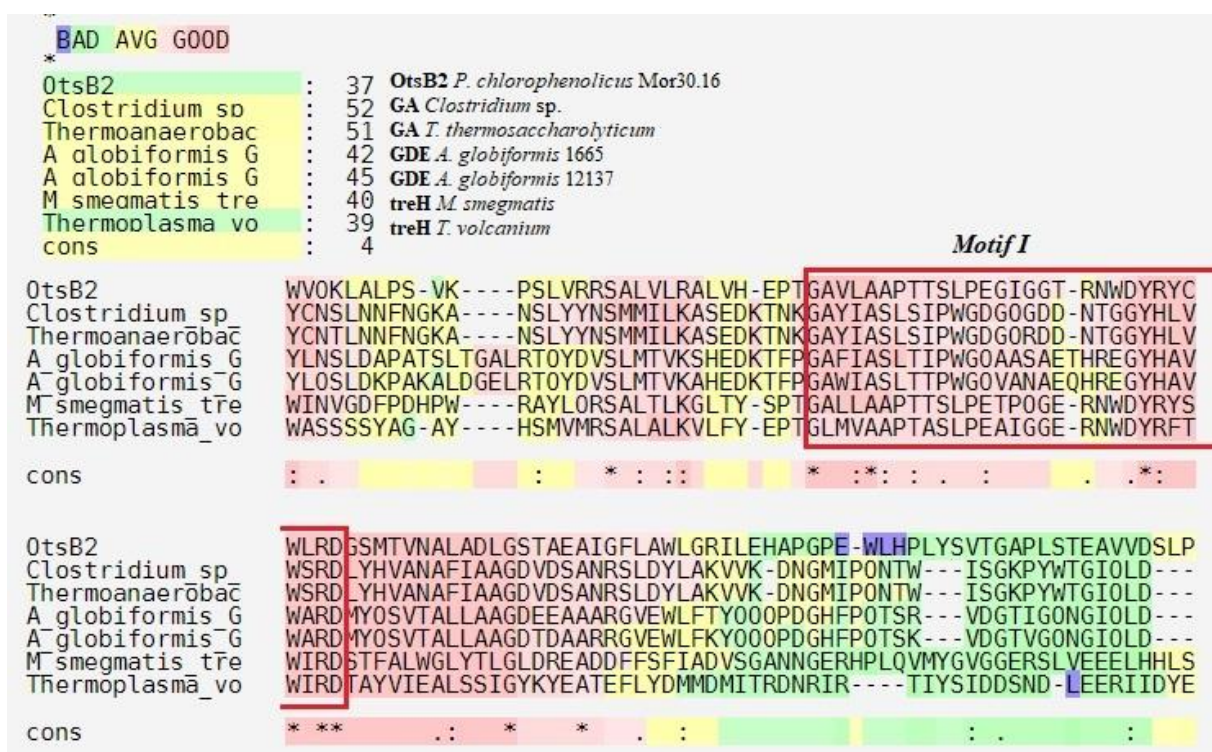


Figura 32. Motivo I de las GH15; se pueden notar que las secuencias (incluyendo OtsB2) comparten los residuos *WXR*D.

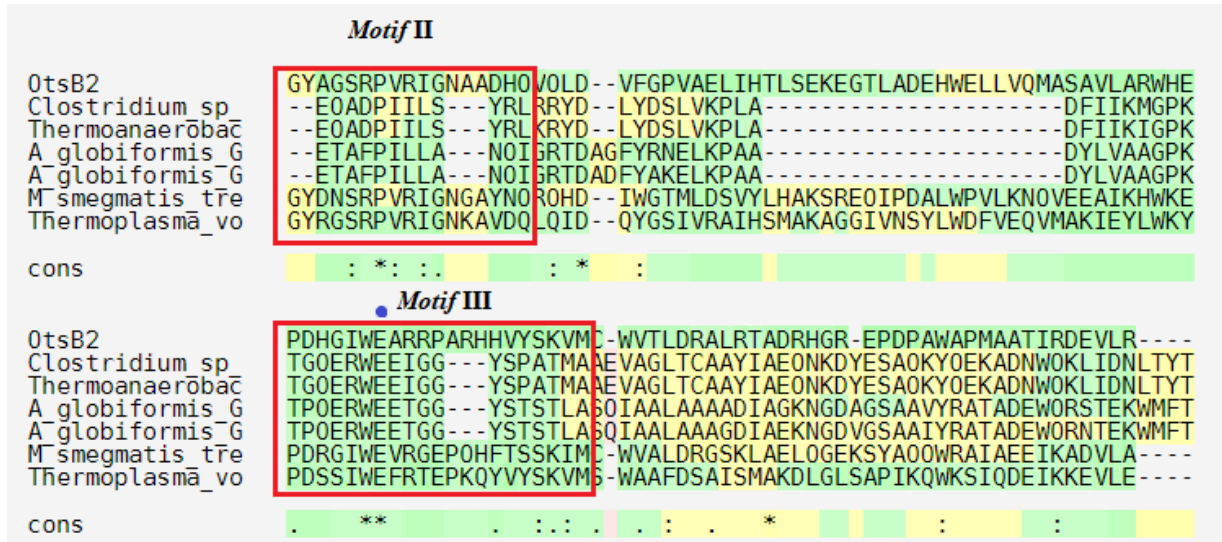


Figura 33. *Motifs* II y III; en estas regiones se pueden hallar más diferencias entre sí. A pesar de esto, son similares los *motifs* de GA con GDE y las TreH con OtsB2. Cabe resaltar el ácido aspártico conservado en el motivo III (señalado con un punto azul) todas las secuencias la poseen.

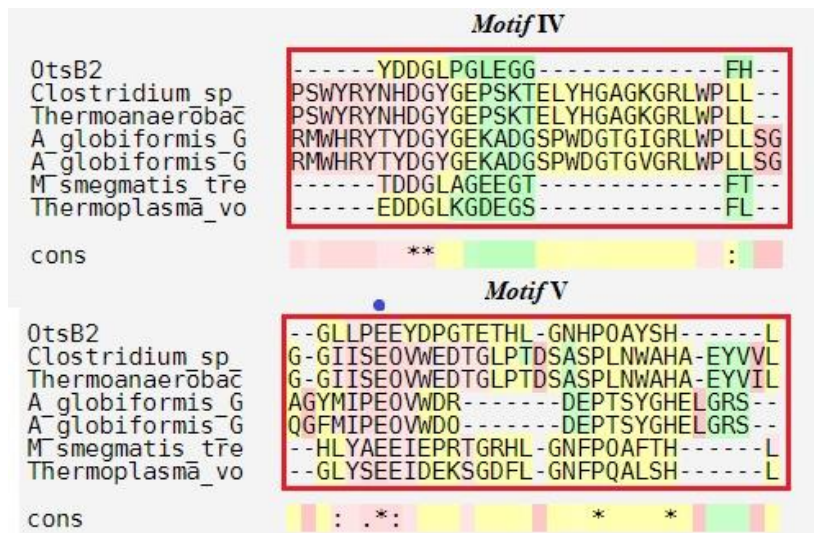


Figura 34. Motivos IV y V; en el motivo V se muestra con un punto azul el segundo ácido glutámico que exhiben los miembros de GH15, cabe resaltar que OtsB2 también lo presenta. Estos dos glutamatos de los *motifs* III y V son los encargados en realizar el ataque nucleofílico para llevar a cabo la hidrólisis.

9.7.2. Alineamiento de OtsB2 y trehalasas

Ya que OtsB2 tuvo un mayor porcentaje de identidad con enzimas trehalasas en contraste otros miembros de la familia GH15, derivado de que se observaron secuencias aminoacídicas similares en los alineamientos anteriores, se realizó una comparación de los motivos de OtsB2 con aquellos presentes en enzimas trehalasas: de esta forma se determinó que OtsB2 posee residuos conservados en este grupo de enzimas (Figuras 35 y 36).

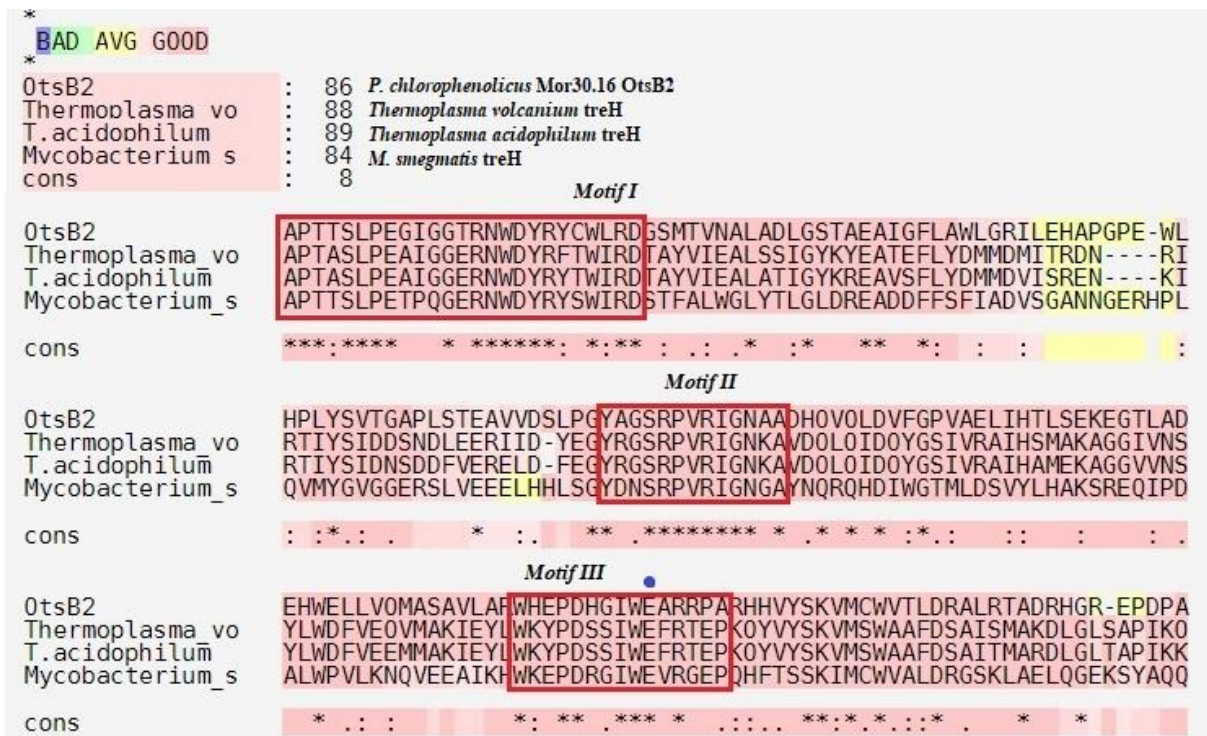


Figura 35. Motivos I, II y III; OtsB2 presenta conservados los *motifs* de enzimas trehalasas. Asimismo, en el motivo III se encuentra señalado con un punto azul el residuo de glutamato que es fundamental para llevar a cabo la actividad catalítica.



Figura 36. Motifs IV y V; los cinco motivos conservados en las glicosil hidrolasas familia 15 figuran en OtsB2, de igual forma, está conservado el residuo de ácido glutámico en el motivo V.

9.8. Digestión del vector pET28a-otsB2

Antes de utilizar el vector que posee a *otsB2* para la expresión heteróloga (Figura 37), se analizó por medio de enzimas de restricción. Para esto, se utilizaron *EcoRI* y *SalI*; la construcción posee un tamaño neto de 7993 pb y al ser digerida, se liberaron fragmentos de 2637 pb y 5356 pb (Figura 38). Posteriormente, se introdujo en *E. coli* BL21 (DE3) para poder expresar la enzima putativa OtsB2.

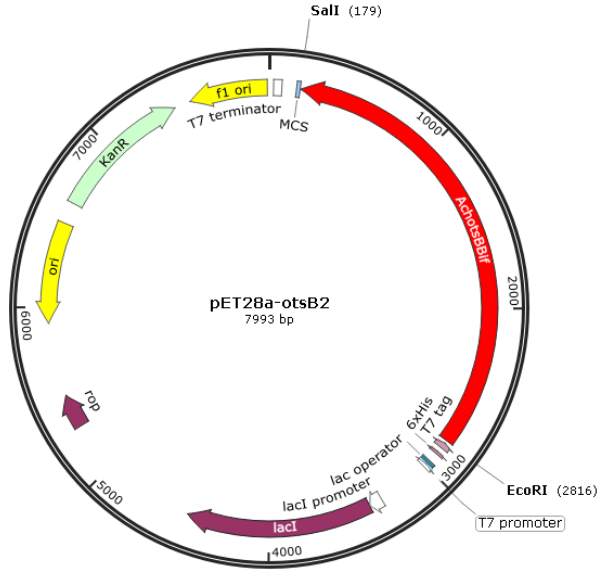


Figura 37. Construcción pET28a-otsB2 (7993 pb); en el mapa se muestran únicamente los sitios de corte de *EcoRI* y *SalI*. El fragmento correspondiente a *otsB2* es de 2637 pb. Mapa realizado con el programa SnapGene®.

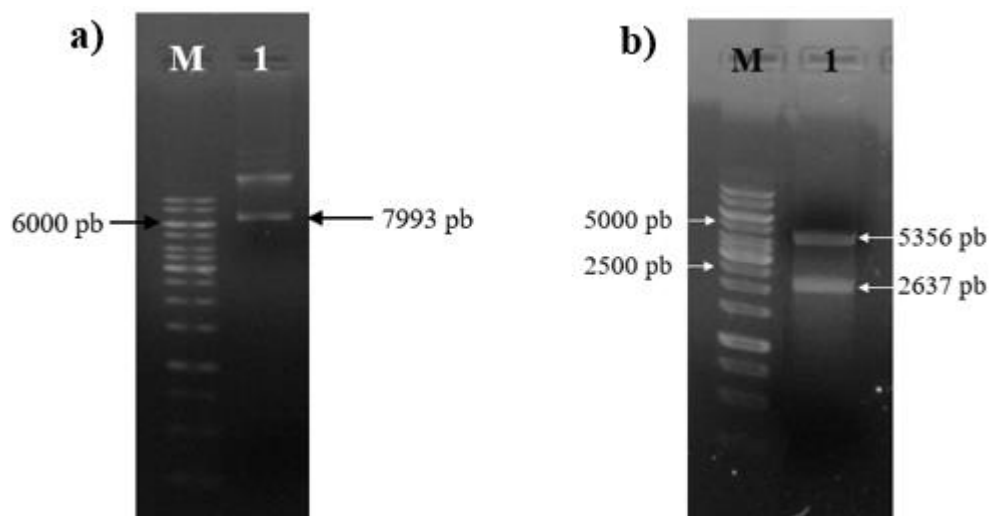


Figura 38. Construcción pET28a-*otsB2*; **a)** se muestra en el carril **1** el vector purificado (7993 pb) mientras que en **b** se observa su digestión con las enzimas *EcoRI* y *SalI*, obteniendo dos fragmentos de 2637 pb y 5356 pb respectivamente (carril **1**).

9.9. Expresión de *otsB2* en *E. coli*

9.9.1. Expresión de *otsB2* en *E. coli* BL21(DE3)

Se logró expresar la enzima putativa OtsB2 en la cepa BL21 (DE3) de *E. coli*; asimismo, se probaron distintos tiempos de inducción para observar el momento en que se tenía producción de proteína; se realizó la inducción de la expresión con 1 mM de IPTG a 30°C por 1, 2 y 4 horas. Se determinó que cuatro horas eran suficientes para obtener producto (Figura 39). Posteriormente, fueron lisadas las células que expresan OtsB2 y se analizó tanto la fracción soluble como la insoluble. Se observó que la proteína se encontraba de manera insoluble, formando cuerpos de inclusión (Figura 40).

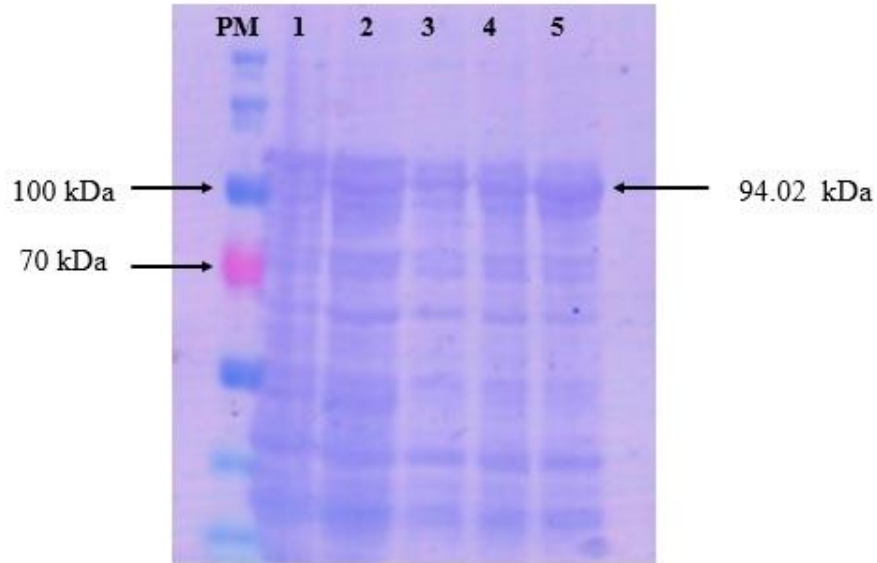


Figura 39. Expresión de *otsB2*; el carril 1 corresponde a la cepa BL21 con el plásmido pET28a (control negativo). El carril 2 atañe a *E. coli* BL21 con pET28a-*otsB2* sin IPTG, mientras que los carriles 2, 3 y 4 concierne a los distintos tiempos de inducción de la expresión (1,2 y 4 horas respectivamente).

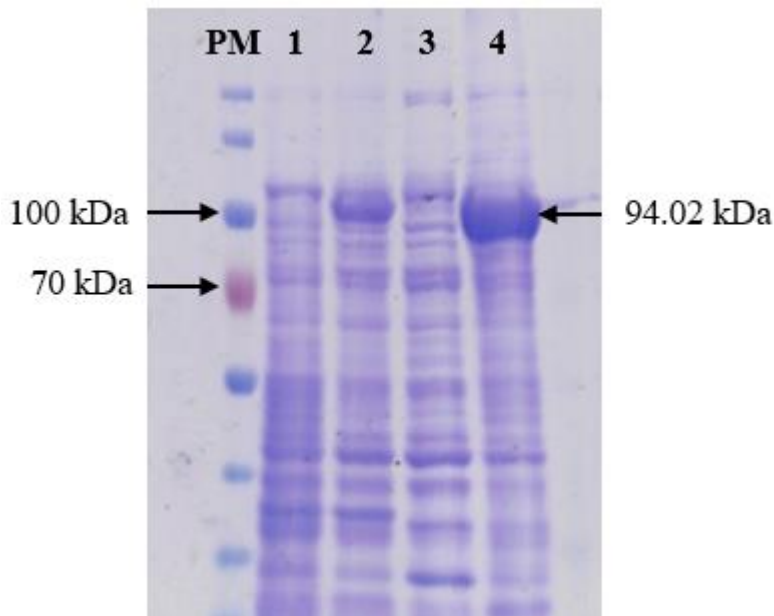


Figura 40. Ubicación de la proteína; en el carril 1 se muestra a *E. coli* BL21 con el vector pET28a sin inserto (control negativo), en el carril 2 se encuentra la inducción de la expresión de OtsB2 a las 4 horas. Sin embargo, en los carriles restantes son señaladas las fracciones de la lisis bacteriana; en el número 3 se observa la fracción soluble (sin proteína de interés), mientras que en el carril 4 es indicada la fracción insoluble (*pellet*), ahí se encuentra OtsB2.

Esto dificultó significativamente la labor de purificar dicha proteína para realizar los ensayos enzimáticos; sin embargo, se probaron distintas condiciones para expresar OtsB2 de forma soluble. En primera instancia, se intentó desnaturalizar la proteína y replegarla, siguiendo el protocolo de Palmer y Wingfield (2012) en donde el lisado celular es centrifugado, se decantó el sobrenadante y posteriormente, el *pellet* celular se lavó tres veces con un buffer que contenía 4 M de urea y 2% de triton-X100. Finalmente, se centrifugó y el precipitado fue resuspendido en buffer de 10 mM Tris/100 mM fosfato de sodio, suplementado con 4 M de guanidina; el extracto fue cargado en la columna Ni-NTA para purificar OtsB2, sin embargo, en ninguna fracción de elución se encontró proteína.

Aunado a esto, se probaron diferentes condiciones de la inducción de la expresión de OtsB2, las cuales se pueden observar en la tabla 9; sin embargo, en ninguna de estas circunstancias se logró obtener a OtsB2 de forma soluble (Figuras 41 y 42).

Tabla 9. Condiciones utilizadas para la expresión de OtsB2 en *E. coli*.

	Condiciones						
	Inicial	1	2	3	4	5	6
Temperatura (°C)	30	15	30	15	30	15	15
[IPTG] (mM)	1	1	0.1	0.1	0	0	0.1
Tiempo (Horas)	4	4	4	4	4	4	2

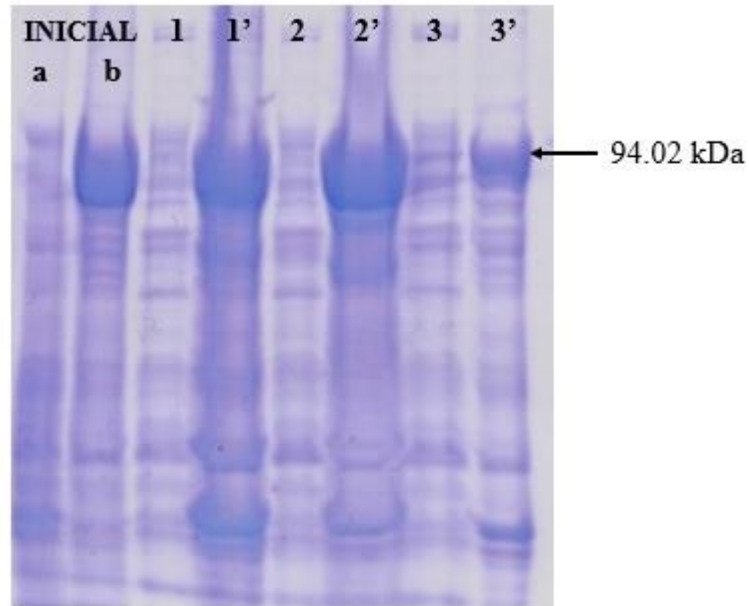


Figura 41. Diferentes condiciones de expresión de OtsB2; en los carriles **a** y **b** se muestran los productos de las fracciones solubles e insolubles (respectivamente) de las condiciones iniciales utilizadas. Los números en los carriles indican la condición empleada con respecto a la tabla 9; los dígitos sin comilla corresponden a las fracciones solubles, mientras aquellos con el signo prima (‘) atañen a las fracciones insolubles (*pellets*).

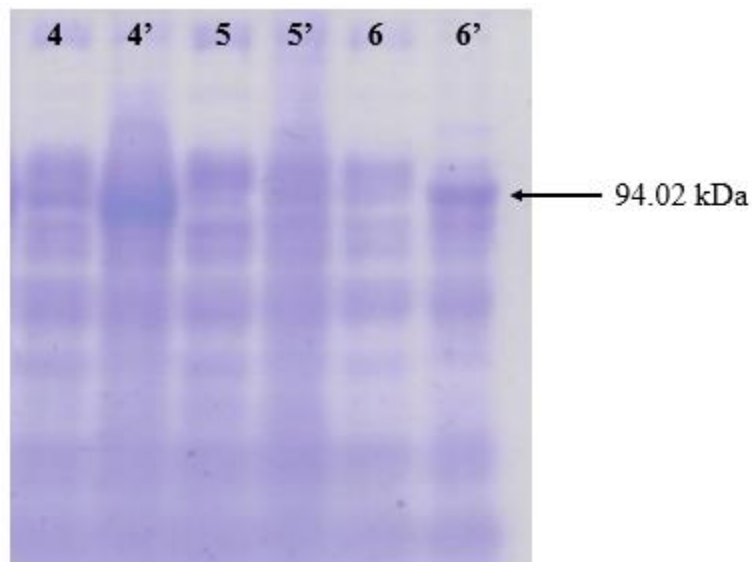


Figura 42. Condiciones 4, 5 y 6 con respecto a la tabla 9; los números con comilla indican fracciones insolubles, mientras aquellos sin este signo (‘) muestran las fracciones solubles. Únicamente en las fracciones insolubles se encuentra OtsB2 (banda de 94.02 kDa).

9.9.2. Expresión de *otsB2* en *E. coli* SHuffle

Derivado de que OtsB2 expresada en *E. coli* BL21 (DE3) se obtuvo formando cuerpos de inclusión, se utilizó la cepa SHuffle del mismo organismo para identificar si de esta manera era posible obtener soluble dicha enzima. Empleando 0.1 mM de IPTG como inductor en todos los casos, fueron probadas distintas condiciones de expresión: 30°C por 4 horas, 15°C por 4 horas, 30°C por 2 y 24 horas; no obstante, OtsB2 continuó obteniéndose de forma insoluble (Figura 43).

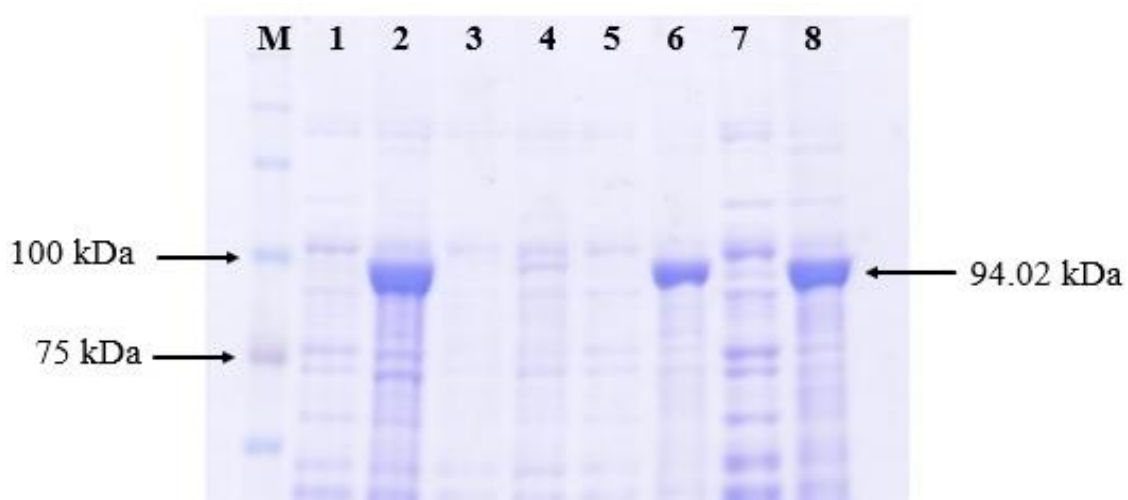


Figura 43. M) Marcador de peso molecular. 1) Fracción soluble de expresión a 30°C por 4 h. 2) Fracción insoluble expresión a 30°C por 4 h. 3) Fracción soluble 15°C por 4 h. 4) Fracción insoluble 15°C por 4 h. 5) Fracción soluble 30°C por 2 h. 6) Fracción insoluble 30°C por 2 h. 7) Fracción soluble 30°C por 24 h. 8) Fracción insoluble 30°C por 24 h.

10. DISCUSIÓN

La trehalosa es una molécula versátil ya que cuenta con múltiples funciones en los organismos que son capaces de sintetizarla; dentro de sus implicaciones se puede hallar como carbohidrato de reserva, molécula señalizadora, componente estructural de membranas y como osmoprotector ante escenarios de estrés abiótico (Mascorro-Gallardo *et al.*, 2005). Por estas razones, es relevante conocer cada una de las vías de síntesis de este azúcar que presentan los organismos, así como las características de las enzimas involucradas, tanto en el anabolismo y catabolismo de dicho disacárido.

Es por ello por lo que en el presente trabajo tuvo como propósito identificar e inferir las actividades de la enzima OtsB2 putativa de *P. chlorophenolicus* Mor30.16, en la cual se encuentra un dominio adicional en el C-terminal que atañe a una glicosil hidrolasa de la familia 15; en primer lugar, para poder realizar el ensayo de complementación se construyeron mutantes de *TPS2* en *S. cerevisiae* por recombinación homóloga, obteniendo un total de 2 mutantes confirmadas (colonias 1 y 6), ya que presentaban el fenotipo termosensible reportado por De Virgilio y colaboradores en 1993, la prototrofia a leucina y mediante PCR se verificó que el *knock out* genético se haya efectuado de la forma deseada. Sin embargo, las colonias 2 y 9 aunque exhibían el fenotipo mutante (crecer sin leucina y termosensibilidad) fueron descartadas para realizar los ensayos de complementación, ya que la amplificación por PCR del sitio donde se llevó a cabo la recombinación presentó un tamaño de 2925 pb, lo cual coincide con la longitud del gen *TPS2*; a pesar de esto, existe la posibilidad de que estas levaduras sean mutantes, con la salvedad de que no se haya quitado completamente la secuencia de *TPS2*, sino que pudo haber sido eliminada parcialmente por la inserción de *LEU2*, de ahí el fenotipo mutante. Únicamente con la secuenciación del genoma de estos organismos se podrá comprobar esto.

Por otro lado, mediante los ensayos de complementación y el alineamiento de secuencias peptídicas de OtsB, podemos conjeturar que posiblemente OtsB2 de *P. chlorophenolicus* no presenta actividad de trehalosa-6-fosfato fosfatasa, ya que su expresión no fue capaz de restaurar el efecto pleiotrópico de la mutación de *TPS2* en *S. cerevisiae*; sugerimos que esto es debido a la falta de dos residuos de aspartato en el *motif* I, los cuales desempeñan un papel crucial para la función catalítica de dicha enzima. En este sentido, es importante señalar que Rao y colaboradores en 2006 resolvieron por cristalografía de rayos X la estructura tridimensional de la trehalosa-fosfato fosfatasa de *T. acidophilum* (utilizada en los alineamientos), así como

identificaron el modo en que ejerce su actividad catalítica; lograron determinar que el motivo I (*DXD*) de estas enzimas es el más importante, ya que el primer aspartato de este *motif* es el encargado de formar por unión covalente, el intermediario fosfoaspartato con la trehalosa-6-fosfato. Por otro lado, el segundo aspartato se encarga de activar una molécula de agua que induce la hidrólisis del grupo fosfato, así como también es uno de los residuos responsables de coordinar el átomo de magnesio (cofactor). En cambio, en el motivo II, el residuo de lisina tiene como función estabilizar el sustrato, mientras que los aspartatos contiguos del motivo III, de igual forma, interactúan con el ligando Mg^{2+} y el sustrato (t6p) por medio de puentes de hidrógeno.

Asimismo, los resultados obtenidos por Shan y colaboradores en el 2016 sugieren la carencia de actividad fosfatasa en OtsB2 de *P. chlorophenolicus*, ya que este equipo de trabajo, al caracterizar OtsB2 de *Mycobacterium tuberculosis*, mediante mutagénesis dirigida de los cuatro aspartatos de los motivos I y III comprobaron la relevancia de estos residuos para la función de la enzima; con el cambio de los residuos Asp 147 y Asp 149 (aminoácidos del *motif* I) mostraron que dicha proteína perdía significativamente su actividad, particularmente al realizar el cambio *D149A*, ya que fue la mutación mayormente perjudicial para la catálisis que ejerce esta enzima, aunque seguía mostrando funcionalidad. Además, demostraron que la mutación en los dos ácidos aspárticos contiguos del motivo III (*D330* y *D331*), también tiene un efecto negativo en OtsB2 de *M. tuberculosis*, aunque en menor grado. Cabe resaltar que estas mutaciones realizadas no fueron aditivas, es decir, evaluaron el efecto de cada una de las sustituciones en los residuos por separado, mientras que OtsB2 de *P. chlorophenolicus* no los posee en simultáneo.

Por otra parte, los análisis del dominio GH15 de OtsB2 putativa indican una similitud significativa con enzimas trehalasas, mostrando un porcentaje de identidad de 31.56%, un *E value* de $2e-96$ (valor más cercano al cero) y una cobertura de consulta del 98%, seguido por las glucoamilasas, con 22.04% de similitud, un *E value* de 0.003 y una cobertura de 49%, de acuerdo con el BLAST; esto indica que es probable que OtsB2 pueda presentar actividad TreH o GA, con potencial tendencia por trehalasa. Cabe resaltar que el porcentaje de identidad con GDE no se tomó en cuenta como homología posible para OtsB2, ya que, aunado a presentar alrededor de 34.38% de similitud, el *E value* es demasiado alto (2.2) y la cobertura de consulta es de apenas 5%, lo que correspondería a una identidad errónea y computada por azar.

Adicionalmente, la matriz de porcentajes de identidad construida con el programa Clustal Omega soporta los resultados de la similitud entre OtsB2 y enzimas trehalasas adquiridos con BLAST del NCBI, debido a que los valores obtenidos son semejantes entre sí; de acuerdo con esto, el análisis realizado con Clustal Omega brindó un porcentaje de identidad de 33.98% y 31.80% de OtsB2 con las trehalasas de *M. smegmatis* y *T. volcanium* respectivamente, valores cercanos a aquellos recabados con el BLAST (33.61% *M. smegmatis* y 31.56% *T. volcanium*); sin embargo, utilizando Clustal Omega hubo una pequeña fluctuación en los porcentajes de identidad de OtsB2 con respecto a los demás miembros de GH15 (GAs y GDEs), aunque aparentemente no son relevantes los cambios.

Derivado de esto, *a priori*, se podría considerar que el porcentaje de identidad de OtsB2 con las enzimas trehalasas es relativamente bajo, empero, por convención, se estima como homología entre secuencias (ya sean aminoacídicas o de nucleótidos) cuando presentan a partir del 30% de identidad (Pearson, 2013). Por otro lado, se debe tener cuidado de únicamente guiarse por este valor, ya que podría haber un sesgo en la información que podría originar un error. Es por ello por lo que también se toman en cuenta los *E values* para y otros parámetros como los *Bits*, para calcular la relación entre secuencias; esto ayuda considerablemente a descartar falsos positivos.

Por otro lado, a través de los alineamientos de OtsB2 con secuencias aminoacídicas de glucoamilasas, glucodextranasas y trehalasas, se lograron identificar los cinco motivos que conforman el sitio activo en las GH15 (Coutinho y Reilly, 1994; Mizuno *et al.*, 2004; Sakaguchi *et al.*, 2015), asimismo, se encuentran conservados en OtsB2; particularmente muestra similitud con los motivos presentes en las trehalasas en contraste con otros miembros de las glicosil hidrolasas 15 ya que comparten más residuos entre sí. Esto concuerda con los reportes de Sakaguchi y colaboradores en 2015, donde caracterizaron las trehalasas de *T. volcanium* y *T. acidophilum* y compararon cada uno de los *motifs* con glucoamilasas. Este equipo de trabajo determinó, que a pesar de la cercanía evolutiva de los miembros de GH15 y poseer conservadas estas cinco regiones que forman el sitio activo, los residuos presentes en ellas pueden variar de acuerdo con el tipo de actividad, ya que estos aminoácidos son los que dan la especificidad por el tipo de sustrato que puedan utilizar; es decir, aparte de los residuos conservados, los que son únicos en cada tipo de enzima, son los responsables de la interacción con el sustrato propio de cada una.

Esta información se relaciona con los alineamientos comparativos de los cinco *motifs* presentes OtsB2 con aquellos encontrados en glucoamilasas, glucodextranasas y trehalasas, ya que se pueden observar ciertas coincidencias y diferencias; en el motivo I, las trehalasas y OtsB2 cumplen con la secuencia *RNWDYRYXW(I/L)RD*, mientras que en el mismo sitio, las GA muestran *NTGGYHLVWSRD* y las GDE presentan *HREGYHAVWARD*. Únicamente todas comparten en este *motif*, los residuos *YXXXWXR*D. En el motivo II, TreH y OtsB2 exhiben *GYXXSRPVIRGN*; por otro lado, en las glucoamilasas se observa *EQADPIILSYRL* y en GDE *ETAFPILLANQI*; todas las secuencias comparten la prolina en este motivo. Aunado a esto, en la región III todos los miembros comparten la secuencia *(I/R)WE*, donde el ácido glutámico es altamente conservado (debido a su relevancia en las actividades de las GH15), aunque los residuos aledaños son diferentes entre cada grupo de enzima y similares en los miembros con misma actividad. En el *motif* número IV las trehalasas y OtsB2 comprenden la secuencia *DDGLXGXEG(S/T)F*, en tanto, las GAs atañen a *PSWYRYNHDGYGE*, mientras las GDE a *RMWHRYTYDGYGE*, todas compartiendo los residuos *DG*. Por último, en el *motif* V cada enzima muestra el residuo *E*, de igual forma, altamente conservado.

Asimismo, para comprobar estas deducciones que la evidencia sugiere, es necesario probar las actividades catalíticas potenciales de OtsB2 de manera experimental. Para esto, se transformó a *E. coli* BL21 (DE3) con la construcción pET28a-*otsB2*; de esta manera, OtsB2 se expresó presuntamente con una etiqueta de histidinas en el N-terminal (para facilitar la purificación), observándose en SDS-PAGE con un peso de ~100 kDa, lo que coincide con el peso molecular teórico inferido por su estructura primaria (94.02 kDa). Sin embargo, la enzima se encontraba de manera insoluble, formando cuerpos de inclusión. Estos agregados son constituidos por proteínas con un plegamiento incorrecto y, en consecuencia, carecen de su estructura nativa lo que deriva en la pérdida de la función biológica. Normalmente los cuerpos de inclusión se encuentran en el citoplasma o periplasma de la cepa hospedera y su formación es atribuida a la alta expresión de la proteína, originando una acumulación anormal de péptidos emergiendo de los ribosomas, sobrepasando la capacidad de acción de las chaperonas (Upadhyay *et al.*, 2012).

Debido a que la formación estos agregados son un evento indeseable que dificulta la producción de proteínas recombinantes solubles, hay factores que se pueden considerar para evitar su formación o, en todo caso, disminuir parcialmente la cantidad de cuerpos de inclusión.

De acuerdo con García-Fruitós (2010), se puede regular el número de copias del gen de interés en el organismo utilizado, para evitar altas concentraciones proteicas; asimismo, otros factores que influyen son la fuerza del promotor utilizado, la estabilidad de los ARNm, optimización de codones, variar la concentración del inductor de la expresión, cambiar la temperatura de expresión en los cultivos utilizados, la expresión de moduladores del plegamiento (chaperonas) y el uso de cepas genéticamente modificadas para favorecer la solubilización de las proteínas.

Es por esto, que en nuestra tentativa de obtener a OtsB2 de forma soluble, se cambiaron los parámetros de la inducción de la expresión; se redujo la concentración de IPTG de 1 mM a 0.1 mM, también se disminuyó la temperatura de expresión en los cultivos utilizados (de 30°C a 15°C), adicionalmente, se probó una combinación de ambas condiciones. Aunado a esto, se acortó el tiempo de la inducción con IPTG (de 4 horas a 2 horas), adicionalmente, fue verificada la presencia de OtsB2 con únicamente expresión basal (sin inductor) y se intentó solubilizar la proteína mediante su desnaturalización con agentes caotrópicos y posterior tratamiento de replegado; asimismo, se utilizó la cepa SHuffle de *E. coli* para obtener a OtsB2 soluble, ya que este organismo produce de manera constitutiva la chaperona DsbC, la cual promueve el plegamiento correcto de proteínas.

Sin embargo, las pruebas resultaron infructíferas ya que en todos los casos la enzima yacía en cuerpos de inclusión. A pesar de esto, aun se pueden implementar diversas estrategias para obtener la proteína, evitando su agregación. Particularmente se intenta expresar OtsB2 de forma soluble, debido a que se preservaría la estructura nativa y función de la enzima putativa. Por otro lado, se tiene contemplado utilizar como último recurso el proceso de desnaturalización y replegado de la proteína, ya que en caso de no observar actividad (o reducida) no se sabría concretamente si corresponde a una característica intrínseca de la enzima o es el resultado consecuente de un plegamiento incorrecto, aunque se encuentre de forma soluble.

Por último, el presente trabajo proporcionó información para poder dilucidar la función de OtsB2 putativa de *P. chlorophenolicus*; cabe resaltar que los datos obtenidos indican que esta enzima no exhibe actividad fosfatasa, sino probablemente trehalasa; adicionalmente, en el genoma de *P. chlorophenolicus* Mor30.16 no se encontró alguna secuencia que corresponda a la enzima TreH, es decir, la única enzima de degradación de la trehalosa, por lo que se hipotetiza que OtsB2 podría desempeñar esta función. Esto resulta relativamente novedoso, ya que son escasos los reportes de trehalasas que pertenecen a la familia 15 de glicosil hidrolasas.

Generalmente, estas enzimas corresponden a las familias 37 y 65, las cuales poseen características distintas, tanto en su secuencia como en topología (Sakaguchi *et al.*, 2015).

Asimismo, se logró comprender que la presencia de esta secuencia en dicho organismo no es un caso aislado, ya que el BLAST de OtsB2 mostró que gran variedad de organismos la poseen, particularmente, miembros de la clase actinobacteria (anexo, c) y aunque el origen de este gen permanece inextricable, dada su distribución y conservación en diversos organismos, es posible que mantenga un rol importante en los seres vivos que la exhiben.

11. CONCLUSIONES

- OtsB2 de *P. chlorophenolicus* carece de la actividad trehalosa-fosfato fosfatasa.
- El dominio GH15 de OtsB2 posee similitud con enzimas trehalasas en comparación con glucoamilasas y glucodextranasas.
- OtsB2 potencialmente podría ejercer actividad trehalasa.

12. PERSPECTIVAS

- Obtener a OtsB2 putativa de forma soluble utilizando otras cepas de expresión de *E. coli* o mediante una fusión traduccional con la proteína de unión a maltosa (MBP).
- Purificar la proteína y realizar ensayos de las actividades trehalosa-fosfato fosfatasa y trehalasa.
- Determinar los parámetros cinéticos K_m y V_{max} para la(s) actividad(es) de OtsB2.
- Realizar mutagénesis dirigida en el motivo I de OtsB2 para añadir los residuos de ácido aspártico y evaluar su efecto sobre la actividad fosfatasa.
- Expresar cada dominio de OtsB2 de forma independiente para evaluar la actividad catalítica.
- Predecir la topología de OtsB2 implementando modelado por homología.
- Construir la mutante $\Delta otsB2$ en *P. chlorophenolicus* Mor30.16.

13. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ashraf, M. & Foolad, M. R. (2007). Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and Experimental Botany* 59, 206–216.
- Aviles-Garcia, M. E., Flores-Cortez, I., Hernández-Soberano, C., Santoyo, G. y Valencia-Cantero, E. (2016). La rizobacteria promotora del crecimiento vegetal *Arthrobacter agilis* UMCV2 coloniza endofíticamente a *Medicago truncatula*. *Revista Argentina de Microbiología*, 48(4), 342–346.
- Avonce, N., Mendoza-Vargas, A., Morett, E. & Iturriaga, G. (2006). Insights on the evolution of trehalose biosynthesis. *BMC Evolutionary Biology*, 6, 1–15.
- Avonce, N., Wuyts, J., Verschooten, K., Vandesteene, L. & Van Dijck, P. (2010). The *Cytophaga hutchinsonii* ChTPSP: First characterized bifunctional TPS-TPP protein as putative ancestor of all eukaryotic trehalose biosynthesis proteins. *Molecular Biology and Evolution*, 27(2), 359–369.
- Barea, J. M. & Azcón-Aguilar, C., (1982). Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungus. *Applied Environ Microbiol*, 43(4), 810–813.
- Bartels, D. & Sunkar, R. (2005). Drought and salt tolerance in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 24(1), 23-58.
- Baudin, A., Ozier-kalogeropoulos, O., Denouel, A., Lacroute, F. & Cullin, C. (1993). A simple and efficient method for direct gene deletion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Research*, 21(14), 3329–3330.
- Boeke, J. D., Garfinkel, D. J., Styles, C. A. & Fink, G. R. (1985). Ty elements transpose through an RNA intermediate. *Cell*, 40(3), 491–500.
- Bowen, G. D. & Rovira, A. D. (1999). The rhizosphere and its management to improve plant growth. *Advances in Agronomy*. Volume 66, 1-102.
- Bownik, A. & Stępniewska, Z. (2015). Protective effects of bacterial osmoprotectant ectoine on bovine erythrocytes subjected to staphylococcal alpha-haemolysin. *Toxicon*, 99, 130–135.
- Buchholz, K. & Seibel, J. (2008). Industrial carbohydrate biotransformations. *Carbohydrate Research*, 343(12), 1966–1979.

- Busse, H. J. (2016). Review of the taxonomy of the genus *Arthrobacter*, emendation of the genus *Arthrobacter sensu lato*, proposal to reclassify selected species of the genus *Arthrobacter* in the novel genera *Glutamicibacter* gen. nov., *Paeniglutamicibacter* gen. nov., *Pseudoglutamicibacter* gen. nov., *Paenarthrobacter* gen. nov. and *Pseudarthrobacter* gen. nov., and emended description of *Arthrobacter roseus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(1), 9–37.
- Chen, X., An, L., Fan, X., Ju, F., Zhang, B., Sun, H. & Dyson, P. (2017). A trehalose biosynthetic enzyme doubles as an osmotic stress sensor to regulate bacterial morphogenesis. *PLoS Genetics*, 13(10), 1–19.
- Coutinho, P.M. & Reilly, P.J. (1994). Structure-function relationships in the catalytic and starch binding domains of glucoamylase. *Protein engineering*, 7(3), 393 – 400.
- Crowe, J. H., Crowe, L. M. & Chapman, D. (1984). Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: The role of trehalose. *Science*, 223(4637), 701–703.
- De Virgilio, C., Bürckert, N., Bell, W., Jenö, P., Boller, T. & Wiemken, A. (1993). Disruption of TPS2, the gene encoding the 100 - kDa subunit of the trehalose - 6 - phosphate synthase/phosphatase complex in *Saccharomyces cerevisiae*, causes accumulation of trehalose - 6 - phosphate and loss of trehalose - 6 - phosphate phosphatase activity. *European Journal of Biochemistry*, 212(2), 315–323.
- Fernández-González, A. J., Martínez-Hidalgo, P., Cobo-Díaz, J. F., Villadas, P. J., Martínez-Molina, E., Toro, N., Tringe, S. G. & Fernández-López, M. (2017). The rhizosphere microbiome of burned holm-oak: Potential role of the genus *Arthrobacter* in the recovery of burned soils. *Scientific Reports*, 7(1), 1–12.
- Flores-Brito, E. (2017). Evaluación de la coinoculación de *Arthrobacter chlorophenolicus* y *Rhizobium tropici* CIAT 899 en *Phaseolus vulgaris* bajo condiciones de humedad limitante. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. México. 1 -84
- García-Fruitós, E. (2010). Inclusion bodies: A new concept. *Microbial Cell Factories*, 9, 2010 –2012.
- Henrissat, B., Callebaut, I., Lehn, P., Mornon, J. & Davies, G. (1996). Conserved catalytic machinery and the prediction of a common fold for several families of glycosyl hidrolases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93, 7090-7094.

- Kuznetsova, E., Nocek, B., Brown, G., Makarova, K. S., Flick, R., Wolf, Y. I. & Yakunin, A. F. (2015). Functional diversity of haloacid dehalogenase superfamily phosphatases from *Saccharomyces cerevisiae*: Biochemical, structural, and evolutionary insights. *Journal of Biological Chemistry*, 290(30), 18678–18698.
- Loredo, O. C., López, R. L. y Espinoza, V. D. (2004). Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas con gramíneas: una revisión. Plant growth-promoting bacteria in association with graminaceous species: a review. *TERRA Latinoamericana*, 22(2), 225–239.
- Lu, Z., Dunaway-Mariano, D. & Allen, K. N. (2005). HAD superfamily phosphotransferase substrate diversification: Structure and function analysis of HAD subclass UB sugar phosphatase BT4131. *Biochemistry*, 44(24), 8684–8696.
- Mascorro-Gallardo J.O., Covarrubias A.A. & Gaxiola, R. (1996). Construction of a CUP1 promoter-based vector to modulate gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 172: 169–170.
- Mascorro-Gallardo, J. O., Avonce, N. e Iturriaga, G. (2005). Biotecnología de la trehalosa en las plantas. *Revista Chapingo Serie Horticultura Aceptado*, 11(2), 193–202.
- Merchant, A. & Richter, A. A. (2011). Polyols as biomarkers and bioindicators for 21st century plant breeding. *Functional Plant Biology*, 38(12), 934–940.
- Miranda-Ríos, J. A., Ramírez-Trujillo, J. A., Nova-Franco, B., Lozano-Aguirre Beltrán, L. F., Iturriaga, G. & Suárez-Rodríguez, R. (2015). Draft genome sequence of *Arthrobacter chlorophenolicus* strain Mor30.16, isolated from the bean rhizosphere. *Genome Announcements*, 3(3), e00360
- Mizuno, M., Tonozuka, T., Suzuki, S., Uotsu-Tomita, R., Kamitori, S., Nishikawa, A. & Sakano, Y. (2004). Structural insights into substrate specificity and function of glucodextranase. *Journal of Biological Chemistry*, 279(11), 10575–10583.
- Neves, M. J., Hohmann, S., Bell, W., Dumortier, F., Luyten, K., Ramos, J. & Thevelein, J. M. (1995). Control of glucose influx into glycolysis and pleiotropic effects studied in different isogenic sets of *Saccharomyces cerevisiae* mutants in trehalose biosynthesis. *Current Genetics*, 27(2), 110–122.
- Palmer, I. & Wingfield, P. T. (2012). Preparation and extraction of insoluble (Inclusion-Body). *Current Protocols in Protein Science*, (8 M), 1–25.

- Paul, M. J., Primavesi, L. F., Jhurrea, D. & Zhang, Y. (2008). Trehalose metabolism and signaling. *The Annual Review of Plant Biology*, 59, 417-441.
- Pearson, W. R. (2013). An introduction to sequence similarity (“homology”) searching. *Current Protocols in Bioinformatics*, (SUPPL.42), 1–8.
- Pereira, I. A. & Castro, P. M. L. (2014). Phosphate-solubilizing rhizobacteria enhance *Zea mays* growth in agricultural P-deficient soils. *Ecological engineering*, 73, 526–535.
- Rao, K.N., Kumaran, D., Seetharaman, J., Bonanno, J.B., Burley, S.K. & Swaminathan, S. (2006). Crystal structure of trehalose-6-phosphate phosphatase-related protein: Biochemical and biological implications. *Protein Science*, 15: 1735 - 1744.
- Rozsypal, J. (2015). The role of water, ice nucleators, and inoculation in insect cold survival. *Open Access Insect Physiology*, 5, 21-30.
- Sakaguchi, M., Shimodaira, S., Ishida, S., nosuke, Amemiya, M., Honda, S., Sugahara, Y., Oyama, F. & Kawakita, M. (2015). Identification of GH15 family thermophilic archaeal trehalases that function within a narrow acidic-pH range. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(15), 4920–4931.
- Schiraldi, C., Di Lernia, I. & De Rosa, M. (2002). Trehalose production: Exploiting novel approaches. *Trends in Biotechnology*, 20(10), 420–425.
- Schulte, P. M. (2014). What is environmental stress? Insights from fish living in a variable environment. *Journal of Experimental Biology*, 217(1), 23–34.
- Shan, S., Min, H., Liu, T., Jiang, D. & Rao, Z. (2016). Structural insight into dephosphorylation by trehalose 6-phosphate phosphatase (OtsB2) from *Mycobacterium tuberculosis*. *FASEB Journal*, 30(12), 3989–3996.
- Shen, B., Hohmann, S., Jensen, R. G. & Bohnert, and H. J. (1999). Roles of sugar alcohols in osmotic stress adaptation. Replacement of glycerol by mannitol and sorbitol in yeast. *Plant Physiology*, 121(1), 45–52.
- Tortone, C. A. y Lucchesi, G. I. (2005). Participación del glutamato en la adaptación osmótica de *Pseudomonas aeruginosa*. *Ciencia Veterinaria*, 7, 20.
- Trevisol, E. T. V., Panek, A. D., De Mesquita, J. F. & Eleutherio, E. C. A. (2014). Regulation of the yeast trehalose-synthase complex by cyclic AMP-dependent phosphorylation. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1840(6), 1646–1650.

- Upadhyay, A. K., Murmu, A., Singh, A. & Panda, A. K. (2012). Kinetics of inclusion body formation and its correlation with the characteristics of protein aggregates in *Escherichia coli*. *PLoS ONE*, 7(3).
- van Leeuwen, J., Andrews, B., Boone, C. & Tan, G. (2015). Rapid and efficient Plasmid construction by homologous recombination in yeast. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2015(9).
- Vandercammen, A., François, J. & Hers, H. G. (1989). Characterization of trehalose-6-phosphate synthase and trehalose-6-phosphate phosphatase of *Saccharomyces cerevisiae*. *European Journal of Biochemistry*, 182(3), 613–620.
- Vurukonda, S. S. K. P., Vardharajula, S., Shrivastava, M. & SkZ, A. (2016). Enhancement of drought stress tolerance in crops by plant growth promoting rhizobacteria. *Microbiological Research*, 184, 13–24.
- Westerberg, K., Elvang, A. M., Stackebrandt, E. & Jansson, J. K. (2000). *Arthrobacter chlorophenicus* sp. nov., a new species capable of degrading high concentrations of 4-chlorophenol. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50, 2083-2092.

14. ANEXOS

a) Secuencia de ADN de *otsB2* de *P. chlorophenicus* Mor30.16

>*otsB2*

ATGCCACGCCTTTGAACCAGAGCGTGGCGGATTCCGCCCTGCTCACCCGGTCCCTTCCGCTG
GACGTACTCCGGTCCCTTCGTCCAGGCTGATGCGGCGGACAGCGGGCTGACCCCGGCGCTGCTG
GACGAACTGAAGGTTCTGGCCCCTGTCCCTGCGCTTTTGGTGGCCTGCAACTACGGCGGCACC
TTGTGCGACGCGGAAGGAATTTCCACCGAGATCCTCCCCTGGGCAGCGCTGCCATCGCCTTG
CGGGCGCTGGCCGCCCTGCCAGCACCCACGCCGCATCATCTCCGGCCGCTCACTGAGGGAC
CTTGCGGCTGTCTCACGGCTCCCCGTGGAGGTCCACCTCATCGGATCGCACGGCGCGGAGTCA
GACATGGGCTTCGCGCACACCCAGACGCTTGCCACCGAATCGGTCCCTGCAGAAGGTCAACGCC
GCACTCAACGAGGCCGTAGGCTTCCAAAGCGGCGTGTGGATCGAACGCAAACCGGTAGCGGTC
TCGGTCCACACCCGCCCGGCCCGCCAGACGTCGTGGCGTCCGTGACCGAAACTGCCGGGAG
ATAGCTCGCGCCACGGACTCTTCTTCAATTGTGGACGGCTCGGTGCTGGACCTCTCCGTGGTG
GAACCGTCCAAGGGTGAGGCACTGGAAACCTCCGGTCCCGGCTCGGCGCCAGTGCCGCCATG
TTCGCGGGCGACGCCGACAGCGACGAACTGGCCATCGCCACCCTCCGCGGCCCGGACCTGGGC
CTGCGGGTTCGGCGGAGGCGAAACCGCAGCGGCACACCGGGTCCGCGACCCCGAGTCTTTGCC
CGGGTCTCGCCCTGCTCTTCGAACTGCGGCGGGCCTGGCTGTTTCGGCGAGGACGCCGTGGGC
CTCGAACGGCACACCATGATCGGCAACGGCTCCTCCACCGCGCTGCTGACCCCGGACGCCAAG
GTCTGCTGGATGAGCCACCCGCTGCCGGACTCCGGCTCGGTGTTTGCCACATCCTGGGCGGT
GACGCGGCCGGCCACTTCTCCGTGGAACCGGCCAAGGCATCGCAGGTGCTGGGCCAGCGGTAC
GTGGACAGCACGATGATCGTCGAAACCGGTGGGCGGACGTCACGGTCACCGACTACCTCGAA
CCGGCCCCGGACGGCATCACCAGCCTGGTCCGGGTGCTGACCGGCACTGGAGCTGCCGGATC
ACTTTTGCGCCGCGGCCGGACTACGCCAACGCCCGTTCGTTCATGGAGGCCCGGGGCGACGAG
CTGCATGTGGTGGGTACGTCCGAACCGATCATCCTTTTCGCGCCGGGCGTGACGTTTCAGCATT
TCCTCGGACGGCAGGCACGGTACCGCCACGGCCTCGGTGAACCTCCAGTCCGGGCCAGTGGTG
CTCAACCTGCGCTGCGGTGACACGGAACCCAGCCCGCAGACCCGCAGGGGGAGACCGACCGC
CGGGCAGAGGTAGCCCTTCATGCCCGCAAGTGGGTGCAGAACTTGCCCTCCCATCCGTGAAA
CCCTCTCTGGTCAGGCGCTCGGCCCTGGTGTCCGGGCGTTGGTCCACGAACCCACCGGCGCA
GTCCCTCGCCGCCCCACCACCTCGCTGCCCGAGGGCATCGGAGGAACACGGAACCTGGGACTAC
CGGTACTGCTGGCTGCGGGACGGATCCATGACCGTCAATGCCCTGGCGGACCTGGGCTCCACT
GCGGAGGCCATCGGGTTTCTCGCCTGGCTGGGGCGGATCCTTGAGCATGCCCCCGGCCCGGAG

TGGCTGCATCCTCTGTACTCCGTCACCGGTGCGCCGCTGTCCACGGAAGCCGTGGTGGACAGC
CTCCCGGGCTACGCCGGTTCCCGCCCGGTGAGGATCGGCAACGCGGGCGGACCATCAGGTCCAG
CTGGACGTCTTTGGCCCCGTTGCAGAGCTGATCCATACCCTGAGCGAGAAGGAGGGCACACTC
GCCGACGAGCATTTGGGAGCTGCTGGTCCAGATGGCCTCGGCAGTCCTGGCCCCGCTGGCATGAG
CCGGACCACGGCATCTGGGAAGCCCGGCGCCCGGCACGGCACCACGTCTACTCCAAGGTGATG
TGCTGGGTGACCCTGGACAGGGCACTGCGGACAGCTGACCGGCACGGCAGGGAGCCTGACCCT
GCCTGGGCTCCGATGGCCGCCACCATCCGGGACGAGGTCCTGCGGGAGGGCTGGGACGAATCG
GCCAGGTCCTACACGGTGGCTTACGACAGCCCGGACCTCGATGCCGCCGTCTTGCATATCGGT
CTTTCCGGTTTGCTGGATGTCACCGATCAGCGCTTCTGGATACGGTCACCGCCGTGGAACGG
GAGTTGAGGGTGGGGCCACAGTCTTCCGCTACCGGTACGACGACGGCCTGCCGGGCCTGGAG
GGCGGCTTCCACATCTGCACCACCTGGCTGATCGAGGGCTACGTGCCCGTGGGCCGCCTCGAT
GAAGCCTGGGATCTGTTGACCAAGTTGGTCAACCTTTTTGGGCCAACCAGGGCTGTTGCCGGAG
GAATACGACCCCGGCACCGAGACCCACCTGGGCAACCACCCGCAGGCGTATTCCCATCTGGGC
TTCATCCGCTGTGCCCGCCTCTGGATGCGCACCAGGCCGGACGGTAG

b) Secuencia aminoacídica de OtsB2 de *P. chlorophenicus* Mor30.16

>OtsB2

MPTPLNQSVDASALLTRSLPLDVLRSFVQADAADSGLTPALLDELKVLARVPALLVACNYGGT
LCDAEGISTEILPLGSAIALRALAALPSTHAAIISGRSLRDLAAVSRLPVEVHLIGSHGAES
DMGFAHTQTLATESVLQKVNAALNEAVGFQSGVWIERKPVAVSVHTRPAPPDVVASVTETARE
IARAHGLFFIVDGSVLDLSVVEPSKGEALETLSRSLGASAAMFAGDADSDELAIATLRGPDLG
LRVGGGETAAHRVRDPESFARVLALLFELRRAWLFGEDAVGLERHTMIGNGSSTALLTPDAK
VCWMSHPLPDSGSVFAHILGGDAAGHFSVEPAKASQVLGQRYVDSTMIVETRWADVTVTDYLE
PAPDGITSLVRVLTGTGAARITFAPRPDYANAPFVMEARGDELHVVGTSSEPIILFAPGVTFESI
SSDGRHGTATASVNLQSGPVVNLNRCGDTEPQPADPQGETDRRAEVALHARKWVQKLALPSVK
PSLVRRSALVLRALVHEPTGAVLAAPTSLPEGIGGTRNWDYRYCWLDRDGSMTVNALADLGST
AEAIGFLAWLGRILEHAPGPEWLHPLYSVTGAPLSTEAVVDSLPGYAGSRPVRIIGNAADHQVQ
LDVFGPVAELIHTLSEKEGTLADEHWELLVQMASAVLARWHEPDHGIWEARRPARHHVYSKVM
CWVTLDRALRTADRHRGEPDPAWAPMAATIRDEVLREGWDESARSYTVAYDSPDLDAAVLHIG
LSGLLDVTDQRFLDVTVAVERELRVGPTVFRYRYDDGLPGLEGGFHICTTWLIEAYVAVGRLD
EAWDLFDQLVNLFGPTGLLPEEYDPGTETHLGNHPQAYSHLGFIRCARLLDAHQAGR

c) **BLAST OtsB2 de *P. chlorophenolicus* Mor30.16**

<input checked="" type="checkbox"/>	Arthrobacter sp. Rue61a, complete genome	1118	1118	93%	0.0	75.07%	CP003203.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Paenarthrobacter aurescens TC1, complete genome	1118	1118	93%	0.0	75.07%	CP000474.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Arthrobacter sp. YN, complete genome	1085	1085	94%	0.0	74.76%	CP022436.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Nocardiopsis dassonvillei strain NCTC10488 genome assembly, chromosome: 1	291	291	38%	2e-73	72.56%	LR134501.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Nocardiopsis dassonvillei subsp. dassonvillei DSM 43111 chromosome 2, complete sequence	291	291	38%	2e-73	72.56%	CP002041.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Nocardiopsis dassonvillei strain HZNU_N_1, complete genome	285	285	38%	8e-72	72.47%	CP022434.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Nocardiopsis dassonvillei strain NOCA502F, complete genome	285	285	38%	8e-72	72.47%	CP017965.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Saccharothrix syringae strain NRRL B-16468 chromosome, complete genome	220	220	41%	2e-52	71.06%	CP034550.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Brevibacterium sp. CS2 chromosome, complete genome	202	202	9%	8e-47	80.86%	CP040020.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Kibdelosporangium sp. MJ126-NF4 complete genome	198	198	39%	1e-45	70.78%	LN877229.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Micromonospora sp. HM134 chromosome, complete genome	167	167	20%	3e-36	72.55%	CP041061.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Actinoalloteichus sp. AHMU CJ021 chromosome, complete genome	167	167	20%	3e-36	73.18%	CP025990.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Actinopolyspora erythraea strain YIM 90600, complete genome	165	165	19%	1e-35	72.93%	CP022752.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Micromonospora coxensis strain DSM 45161 genome assembly, chromosome: 1	148	148	20%	1e-30	72.11%	LT607753.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Allokutzneria albata strain DSM 44149 genome assembly, chromosome: 1	139	139	20%	6e-28	72.01%	LT629701.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Plantactinospora sp. KBS50, complete genome	124	124	39%	2e-23	69.72%	CP022961.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Actinomadura sp. WMMA1423 chromosome	121	209	26%	2e-22	70.92%	CP041244.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Plantactinospora sp. BB1 chromosome, complete genome	119	119	21%	8e-22	71.18%	CP028159.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Micromonospora krabiensis strain DSM 45344 genome assembly, chromosome: 1	119	119	10%	8e-22	74.83%	LT598496.1

Figura 44. BLAST de OtsB2; se observa como gran variedad de organismos poseen una secuencia similar a OtsB2 de *P. chlorophenolicus* Mor30.16.

d) **OtsB bifuncional de *Saccharothrix espanaensis* (BN6_04100)**

En esta bacteria se encuentra una secuencia semejante a OtsB2 de *P. chlorophenolicus*; esta enzima putativa se compone de 843 aminoácidos, posee un dominio N-terminal que corresponde a una trehalosa-fosfato fosfatasa y exhibe un dominio adicional en el C-terminal que atañe a una glicosil hidrolasa de la familia 15 (de la misma forma que en *P. chlorophenolicus* Mor30.16) (Figura 45).

Sin embargo, al parecer es la única secuencia en el genoma de *S. espanaensis* que codifica para una OtsB, asimismo, yace en forma de operón, adyacente a la trehalosa-fosfato sintasa (*otsA*), siendo el modo en que regularmente están dispuestos los genes de biosíntesis de trehalosa en la mayoría de los organismos procariontes (Figura 46). Además, con base en alineamientos realizados, se puede observar que OtsB de *S. espanaensis* posee conservados los residuos de los *motifs* I, II y III que forman el sitio activo en las trehalosa-fosfato fosfatasas (Figura 47). Aunado a esto, presenta los motivos que estructuran la región catalítica en las

enzimas trehalasas de la familia 15 de glicosil hidrolasas (Figura 48). Cabe resaltar que OtsB2 de *P. chlorophenolicus* y OtsB de *S. espanaensis* muestran un porcentaje de identidad de 52.86% (GenBank: CCH27741.1).

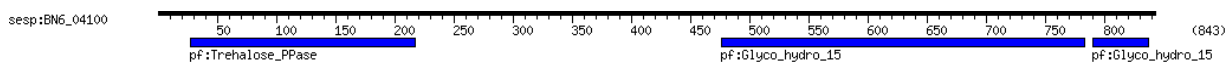


Figura 45. Dominios catalíticos putativos de la enzima OtsB de *S. espanaensis*; en la región N-terminal yace el dominio trehalosa-fosfato fosfatasa, mientras que en el C-terminal se encuentra un dominio glicosil hidrolasa de la familia 15.

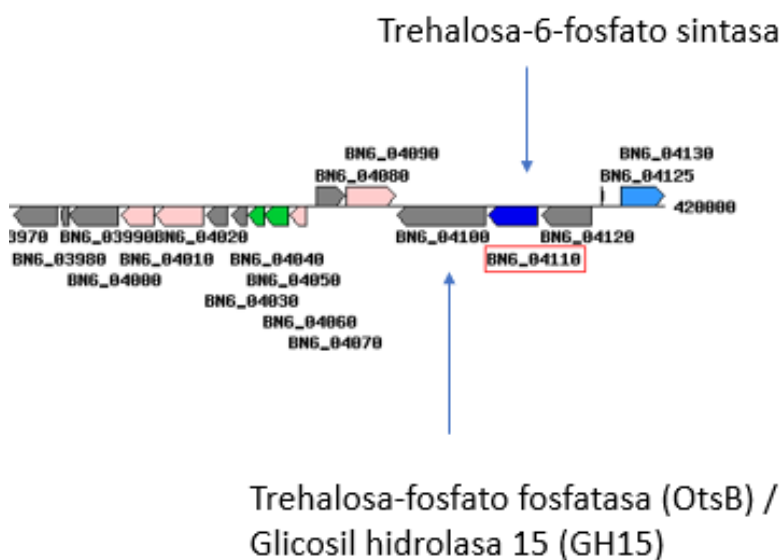


Figura 46. Disposición de OtsB bifuncional en el genoma de *S. espanaensis*; *otsA* y *otsB* están juntos como generalmente se suelen encontrar estos genes en organismos procariontes.

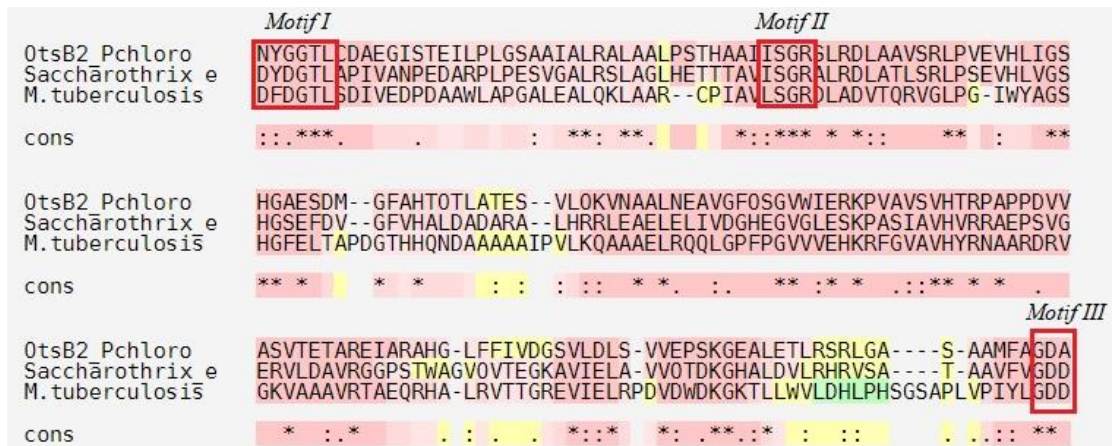


Figura 47. Motifs de las trehalosa-fosfato fosfatasas; se logra observar que la secuencia de *S. espanaensis* conserva los residuos de aspartatos en el motivo I, sin embargo, OtsB2 de *P. chlorophenicus* no los posee.



Figura 48. Motivos de trehalasas en OtsB de *S. espanaensis*; los residuos de los motifs figuran en esta enzima putativa. Con un punto azul son señalados los residuos de ácido glutámico que intervienen directamente en la catálisis.

Cuernavaca, Mor., 25/08/2020

DRA. DULCE MARÍA ARIAS ATAIDE
DIRECTORA GENERAL DE SERVICIOS ESCOLARES
P R E S E N T E.

Por este conducto comunico a Usted, que he revisado el documento que presenta el Pasante de Biólogo: **Fernando Aranda Lozano**, con el título del trabajo: **CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LA ENZIMA OtsB2 de *Pseudarthrobacter chlorophenicus* Mor30. 16.** Quien optó por la Modalidad de Titulación: **Trabajo de Desarrollo Profesional por Etapas**, como lo marca el Reglamento de Titulación Profesional vigente de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

En calidad de miembro de la comisión revisora, expreso la siguiente decisión:

VOTO A FAVOR: SI () NO ()

ATENTAMENTE



DR. EDGAR DANTAN GONZÁLEZ



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

EDGAR DANTAN GONZALEZ | Fecha:2020-08-25 19:29:45 | Firmante

F7hiuwDhndP2hMMd4mvfBPYeW8y8qcVPhmMKF7OEA mg6Ye6kuGBrpECjyA4MbHQGQqXDvgF+vsqB978Wlf4Zka1ss5M3XkPgg7NRlaLtYwoRxMPjytny+hPCU5/ildZy+cf2N
GHOjJ8dklnXz6oguA5EENW59Nx/chF7huShL6kPB+Al/s76U72PnJ//Ppg52mQ1Xrxt dw47qNMCR9Fd+cR8RO9ftkrpdt9QL1J0jxh765NLicQPadRggesjyAotpWS6Tbih/g6CR6u3K
XjkUUazdLM2Or8akyEiB3+jVLE68XGKZpfiteEx0zyZ81F5IX2DRchHMKP6AzX0sxp iTA==

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



[zb7YBg](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/vB2gSpxH9IoT06K2r6k5Wr9jKd60A40a>



Cuernavaca, Mor., 28 de agosto de 2020

DRA. DULCE MARÍA ARIAS ATAIDE
DIRECTORA GENERAL DE SERVICIOS ESCOLARES
P R E S E N T E.

Por este conducto comunico a Usted, que he revisado el documento que presenta el Pasante de Biólogo: **Fernando Aranda Lozano**, con el título del trabajo: **CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LA ENZIMA OtsB2 de *Pseudarthrobacter chlorophenicus* Mor30. 16.** Quien optó por la Modalidad de Titulación: **Trabajo de Desarrollo Profesional por Etapas**, como lo marca el Reglamento de Titulación Profesional vigente de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

En calidad de miembro de la comisión revisora, expreso la siguiente decisión:

VOTO A FAVOR: SI (X) NO (____)

A T E N T A M E N T E



DR. JOSÉ AUGUSTO RAMÍREZ TRUJILLO



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

JOSE AUGUSTO RAMIREZ TRUJILLO | Fecha:2020-08-28 15:49:42 | Firmante

gWEXqNbrs1w3wbjWJ/qbz95wjlveY7ypeXLT/3Eduk+l2OqmeWYv2atZi0yjlwUtpCMM/78dVtJuqNbyop0AEDGqj8bSDUW/IUWmNCIX0pJ+1cbUgLt12OY3TR4SQI56P5i2zJXUM62a9FOEuNGmpgp1WvXnyc1AGaiCm+lKfPDixYSP/8A5pY8/TepQNZ36LplptGtBi2jsjzD/XZvPk+UfXxyTxSDZ+tRo6Wz7PfmLXye9ppm05PYrmAe+yUqk9zFbR8ugJfkKDGmIxxwaJfAnCGDN8J8ACBu3am0V1tEmzg8Kns6UhigCePYD+i/dwllxGdGX5EKeeC69+w1Lnw==

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



Cyxz58

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/mgiVHpx4QEH5xp5PKb6ufWUousrKeJie>



Cuernavaca, Mor., 25 de agosto de 2020

DRA. DULCE MARÍA ARIAS ATAIDE
DIRECTORA GENERAL DE SERVICIOS ESCOLARES
P R E S E N T E.

Por este conducto comunico a Usted, que he revisado el documento que presenta el Pasante de Biólogo: **Fernando Aranda Lozano**, con el título del trabajo: **CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LA ENZIMA OtsB2 de *Pseudarthrobacter chlorophenicus* Mor30. 16.** Quien optó por la Modalidad de Titulación: **Trabajo de Desarrollo Profesional por Etapas**, como lo marca el Reglamento de Titulación Profesional vigente de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

En calidad de miembro de la comisión revisora, expreso la siguiente decisión:

VOTO A FAVOR: SI () NO ()

ATENTAMENTE



DRA. MARÍA LUISA CASTREJÓN GODÍNEZ



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD
DE CIENCIAS
BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Licenciatura en Biología

Programa Educativo de Calidad *Acreditado* por el CACEB 2018-2023

Cuernavaca, Mor., a 25 de agosto de 2020

DRA. DULCE MARÍA ARIAS ATAIDE
DIRECTORA GENERAL DE SERVICIOS ESCOLARES
P R E S E N T E.

Por este conducto comunico a Usted, que he revisado el documento que presenta el Pasante de Biólogo: **Fernando Aranda Lozano**, con el título del trabajo: **CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LA ENZIMA OtsB2 de *Pseudarthrobacter chlorophenicus* Mor30. 16.** Quien optó por la Modalidad de Titulación: **Trabajo de Desarrollo Profesional por Etapas**, como lo marca el Reglamento de Titulación Profesional vigente de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

En calidad de miembro de la comisión revisora, expreso la siguiente decisión:

VOTO A FAVOR: SI () NO ()

A T E N T A M E N T E

DR. ALEXIS JOAVANY RODRÍGUEZ SOLÍS



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

MARIA DEL RAYO SANCHEZ CARBENTE | Fecha:2020-08-25 19:15:07 | Firmante

o8NbQ7pugny3tPQBkPTmyhA8EzGswJ63MW9Befs2JDqA1xFafJgb2VCV9jjB5kgOsZ1NRk4KW4fNpv/kXvPMfzOFquYr9ixaFWetw7HVG597IjU+2G/kw+BotgGgnYxVtg6
AuRSeOx2XxZxPibCeZTqK8lpnrpR+jbQL5mCPts9UJgHEzB0toSibtX9rt4ZvFNp718/jQ82WptGEwmKKeZL6nqSin6bicjMakRas4LgdojvaxfnLdcgGG6dP3Sr4DNbt/S7QleU
m8QK2Dhb7WOIHfGdpS59EcoMOV9cRT8242aZIGH6NsdofMuyeM3gZ9B9wGxabBJ5H5jOziKzA==

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



70kVjg

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/mMdmx7X3rvR8AWEZQL267uGBcPs9CTjN>

