



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Desarrollo de una herramienta genética para favorecer la expresión de genes provenientes de la diversidad microbiana

Adán Andrés Ramírez Rojas

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Química
Bogotá, Colombia
2019

Desarrollo de una herramienta genética para favorecer la expresión de genes provenientes de la diversidad microbiana

Adán Andrés Ramírez Rojas

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Ciencias - Bioquímica

Director:

Pedro Filipe de Brito Brandão, Ph.D.

Codirector (a):

Álvaro Monguí Cruz, Ph.D.

Línea de Investigación:

Biotecnología Molecular

Grupo de Investigación:

Grupo de Estudios para la Remediación y Mitigación de Impactos Negativos al Ambiente
(GERMINA)

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Química

Bogotá, Colombia

2019

Agradecimientos

Agradezco a mis directores, el profesor Pedro Filipe de Brito Brandão por haberme brindado su confianza cuando ingresé a la Universidad Nacional y su guía en los procesos durante la maestría. A Álvaro Monguí, uno de mis primeros guías científicos, quien me invitó a hacer parte de sus proyectos de investigación y confió en mis capacidades para trabajar con él desde el inicio de mi carrera como investigador.

A la familia “corpogénica”, en especial a Patricia del Portillo, María Mercedes Zambrano, Dayana Calderón y Luz Karime Afanador, por el apoyo y motivación para finalizar este proceso a pesar de los tropezones en el camino.

A Víctor de Lorenzo y Esteban Martínez del CNB en Madrid, gracias a su recibimiento y ayuda se dio el inicio de este proyecto y aprendí demasiado de su calidad como personas y científicos.

A Colciencias, que brindó el mayor financiamiento para la realización de este proyecto mediante el contrato FP44842-086-2016 con la Corporación CorpoGen.

Resumen

Los transposones son secuencias de ADN que pueden ser empleadas como herramientas en biología molecular y biotecnología. Por ejemplo, pueden ser empleados como una alternativa que permite mejorar la expresión heteróloga de genes presentes en ADN episomal que no son reconocidos por los hospederos bacterianos generalmente empleados. En el presente trabajo, se describe el desarrollo de “Mu_TnX”, un transposón de tipo Mu que puede ser empleado en estudios de análisis funcional de genes en diferentes hospederos bacterianos. Mediante herramientas computacionales, se realizó el diseño de la secuencia del transposón y se definió la estrategia para su ensamblaje. Utilizando metodologías de síntesis de ADN, PCR y clonación tradicional, se llevó a cabo la construcción de este. Se validó el funcionamiento de esta herramienta mediante la evaluación de su capacidad de transposición *in vitro* sobre un control de actividad empleando cepas de *Escherichia coli* y *Pseudomonas putida*. La capacidad de transposición *in vitro* fue comprobada al recuperar clones en las cepas evaluadas que exhibieron resistencia a los antibióticos empleados como marcadores de selección y la capacidad de inducir la expresión de genes se evidenció en clones que expresaron la proteína verde fluorescente bajo inducción del compuesto 3-metil benzoato. Aunque no se logró comprobar la misma capacidad en ADN metagenómico, Mu_TnX es la primera herramienta genética de este tipo capaz de funcionar en hospederos de diferentes especies, y se espera que su desarrollo aporte a los estudios de metagenómica funcional para el descubrimiento de genes y compuestos novedosos.

Palabras clave: transposón, herramienta genética, clonación, plásmidos, expresión heteróloga, metagenómica funcional

Abstract

Transposons are DNA sequences that can be used as tools in molecular biology and biotechnology. For example, they can be used as an alternative to improve heterologous expression of genes present in DNA that are not recognized by the generally used bacterial hosts. This work describes the development of "Mu_TnX", a Mu type transposon that can be used in functional studies of genes in different bacterial hosts. Using computational tools, the design of the transport sequence was carried out and the strategy for its assembly was defined. Mu_TnX transposon was assembled using methodologies of DNA synthesis, PCR and traditional cloning. The functioning of this tool was validated by evaluating its *in vitro* transposition capacity on a performance control plasmid using strains of *Escherichia coli* and *Pseudomonas putida*. *In vitro* transposition capacity was verified by recovering clones in the evaluated strains that exhibit resistance to the antibiotics used as selection markers. The ability to induce the expression of genes was observed in clones expressing the green fluorescent protein under induction of 3-methyl benzoate. Although the same activity could not be proven in metagenomic libraries, Mu_TnX is the first genetic tool of this kind that can be used in different bacterial hosts. It is expected that the further development of this tool will contribute to studies in functional metagenomics and the discovery of novel genes and compounds.

Key words: transposon, genetic tool, cloning, plasmids, heterologous expression, functional metagenomics

Contenido

Resumen	V
Abstract	VI
Introducción	1
1. Marco Teórico	5
1.1 Transposones	5
1.1.1 Uso de transposones como herramientas en biología molecular	7
1.1.2 Transposones Mu	7
1.2 Metagenómica.....	9
1.2.1 Análisis metagenómico basado en secuencia	10
1.2.2 Análisis funcional sobre ADN metagenómico	11
1.3 Microorganismos empleados como hospederos de librerías metagenómicas.....	12
1.3.1 La bacteria <i>E. coli</i> como sistema de expresión.....	12
1.3.2 Hospederos alternativos de librerías de ADN	14
2. Antecedentes y Justificación	16
3. Objetivos	18
3.1 Objetivo general.....	18
3.2 Objetivos específicos	18
4. Materiales y Métodos	19
4.1 Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento	19
4.2 Plásmidos.....	19
4.3 Diseño del transposón Mu_TnX.....	19
4.4 Construcción y purificación del transposón.....	21
4.5 Validación de funcionamiento del transposón	24
4.6 Ensayo sobre librerías metagenómicas	25
5. Resultados y Discusión	26
5.1 Diseño del transposón	26
5.2 Ensamblaje y purificación de Mu_TnX.....	29
5.2.1 Estrategia de construcción.....	29
5.2.2 Obtención del casete XylS-Pm	30
5.2.3 Síntesis de plantilla y clonación XylS-Pm	31
5.2.4 Clonación del fragmento Mu-T7.....	33
5.2.5 Obtención de Mu_TnX mediante PCR.....	34

5.3 El transposón Mu_TnX promueve la expresión de GFP en diferentes hospederos	35
5.4 Transposición de Mu_TnX en una librería metagenómica	39
5.5 Relevancia de las herramientas para apoyar estudios de metagenómica funcional.....	42
6. Conclusiones y Perspectivas	44
6.1 Conclusiones.....	44
6.2 Perspectivas.....	45
Anexos.....	47
Bibliografía.....	51

Introducción

Los estudios funcionales a través de técnicas que requieren de la expresión heteróloga de genes (ej. metagenómica funcional) pueden ser difíciles debido a que la identificación de estos genes depende de muchos factores como el hospedero y vector seleccionados, el tamaño del gen de interés, su abundancia en la fuente metagenómica, el método de detección empleado, la eficiencia de la expresión en el hospedero, o incluso la estabilidad de la función de los genes de interés (Ekkers *et al.*, 2012).

A lo largo de los últimos años se han implementado varias estrategias para sobrellevar estas dificultades como por ejemplo el uso de diferentes hospederos bacterianos, diferentes vectores de clonación y expresión, uso de vectores *shuttle*, uso de distintos métodos de detección (genes reporteros, complementación), modificaciones genéticas en los hospederos para aumentar el reconocimiento de sitios de unión al ribosoma o la co-expresión de chaperonas que faciliten el plegamiento de las proteínas (Ekkers *et al.*, 2012; Uchiyama & Miyazaki, 2009).

A pesar del desarrollo y empleo de estas estrategias, los estudios de metagenómica funcional para la identificación de nuevos compuestos siguen teniendo resultados con rendimientos muy bajos (Coughlan *et al.*, 2015). En ese sentido, un análisis predictivo en tres modelos de expresión génica mostró que solo hasta el 40% de las actividades enzimáticas codificadas en genomas procariotas de diferentes grupos taxonómicos pueden ser accesibles para la bacteria *Escherichia coli*, siendo este el hospedero por excelencia. Esto quiere decir que una fracción significativa de genes de estos genomas pueden no ser

compatibles con las maquinarias transcripcional y traduccional de este hospedero bacteriano (Gabor *et al.*, 2004). Esto implica que aún se requiere de estrategias destinadas a aumentar la transcripción génica en estudios de metagenómica funcional que permitan superar las limitaciones actuales.

En ese sentido, los transposones son elementos genéticos que durante las últimas décadas han sido empleados como herramientas con diversas aplicaciones en biología molecular, incluyendo estrategias para facilitar estudios de secuenciación, detección de polimorfismos, y de particular interés, para reprimir o inducir la expresión funcional de genes para diferentes organismos (Haapa *et al.*, 1999; Orsini *et al.*, 2007; Ivics *et al.*, 2009; Martínez-García *et al.* 2014). Entre estas herramientas, el mecanismo de transposición del bacteriófago Mu es uno de los mejor caracterizados, ya que se ha observado que es un sistema altamente eficiente y con baja especificidad, y los requisitos para su acción *in vitro* son menores en comparación con su actividad *in vivo*, haciendo del transposón Mu una herramienta ideal para diferentes campos de investigación (Harshey, 2014).

Con base en la necesidad actual de mejorar la expresión funcional de genes en librerías metagenómicas y otros tipos de ADN episomales, en una investigación anterior se desarrolló el transposón TnC_T7 (Mongui *et al.*, 2016). Este elemento móvil tiene la capacidad de promover la transcripción de genes heterólogos por la ARN polimerasa T7. Además, el transposón TnC_T7 incluye el gen que codifica la ARN polimerasa T7 bajo un promotor inducible, por lo que su uso no está restringido a hospederos bacterianos que codifican esta enzima a partir de su genoma (por ejemplo, *E. coli* BL21). Sin embargo, debido al sistema de inducción empleado, existen aún limitaciones en la versatilidad de este transposón con respecto a los hospederos bacterianos en que se puede utilizar.

Por este motivo, en el presente trabajo se llevó a cabo el desarrollo de una herramienta basada en el transposón TnC_T7, nombrado Mu_TnX, con el fin de ampliar el rango de hospederos bacterianos que soporten su implementación.

Para esto, fue necesario llevar a cabo un diseño de este dispositivo a base de secuencias de ADN; su construcción mediante herramientas de biología molecular y tecnología de ADN recombinante; y finalmente, la validación del funcionamiento del transposón sobre una librería metagenómica, empleando como hospederos a *E. coli* y *Pseudomonas putida*. Esto, esperando que el desarrollo de esta herramienta genética mejorada permita abordar de forma más eficiente la expresión de genes en ADN episomal, principalmente en estudios de metagenómica funcional.

1. Marco Teórico

1.1 Transposones

Los transposones, o elementos transponibles, corresponden a secuencias de ADN capaces de moverse de una posición genómica a otra. En los últimos años ha habido una expansión en el conocimiento de estas secuencias móviles, asociada con el número creciente de genomas secuenciados pertenecientes a todos los reinos de la vida (Feschotte & Pritham, 2007). Los transposones se encuentran ampliamente distribuidos tanto en procariotas como eucariotas, y se ha observado que han modificado significativamente el curso de la evolución por medio de la incorporación de variaciones genéticas o por generar inestabilidad cromosomal (Kazazian, 2004). Cuando los elementos transponibles se mueven, a menudo muestran poca selectividad en la secuencia de los sitios de inserción. Como resultado, los transposones pueden insertarse dentro de los genes, interrumpiendo completamente la función de estos, o insertarse dentro de secuencias reguladoras, donde pueden llevar a cambios en la forma en que se expresa un gen (Watson *et al.*, 2014).

Aunque existen diferentes maneras de clasificar los elementos transponibles, es importante diferenciar a los transposones de Tipo I (retrotransposones) y de Tipo II (transposones de ADN), así como de acuerdo con su mecanismo de transposición, replicativo o no replicativo. Los retrotransposones, requieren durante el proceso un transcrito intermediario de ARN sobre el que posteriormente actúa una transcriptasa reversa para su posterior inserción en el sitio diana. Por otro lado, los transposones de ADN se movilizan mediante

mecanismos de “cortar y pegar” (transposición no replicativa) o “copiar y pegar” (transposición replicativa) (figura 1). Los transposones de ADN que poseen un gen que codifica su propia transposasa, se denominan transposones autónomos. Aquellos segmentos de ADN móvil más simples que no contienen un gen para transposasa, son conocidos como transposones no autónomos (Pray, 2008; Watson *et al.*, 2014).

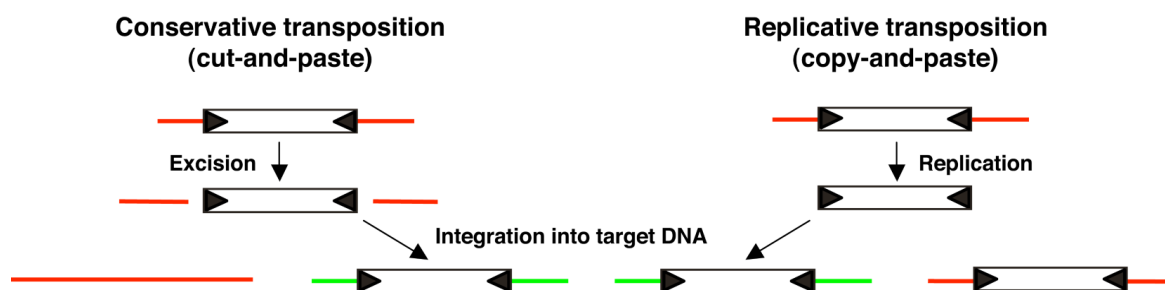


Figura 1. Mecanismos de acción de los transposones de ADN. Tomado de Ivics *et al.*, 2009.

Las transposasas (E.C. 2.7.7), son específicamente enzimas de tipo fosfotransferasa que actúan generalmente de forma multimérica, catalizando los procesos de trasposición mediante el rompimiento de los enlaces fosfodiéster de ADN tanto en el elemento transponible como en el sitio de inserción (Hickman *et al.*, 2010). Estas enzimas reconocen regiones conocidas como “repeticiones terminales invertidas”, que son secuencias complementarias de 9 a 40 pares de bases presentes en los dos extremos de los transposones. Adicionalmente, todos los elementos transponibles contienen “repeticiones flanqueantes directas” que cumplen un papel en la inserción del transposón dentro de una nueva secuencia. Estas repeticiones son dejadas como huellas y pueden alterar la expresión de genes (Pray, 2008).

Aunque en la naturaleza la mayor parte de los transposones se encuentran silenciados, muchos de estos tienen roles evolutivos de gran importancia al alterar la función de genes mediante inserción, inducir rearrreglos en el cromosoma, o al insertar genes novedosos o secuencias de regulación génica

(Feschotte & Pritham, 2007). Algunos ejemplos destacables, son la transferencia de genes que confieren resistencia antimicrobiana en bacterias (Bennett, 2009); alteraciones fenotípicas en peces (Koga *et al.*, 2006) y mutaciones en plantas (Wicker *et al.*, 2016).

1.1.1 Uso de transposones como herramientas en biología molecular

Debido a su función y gracias a los conocimientos generados sobre los transposones en las últimas décadas, se ha logrado que estos elementos genéticos sean una interesante herramienta con una variedad de aplicaciones en la investigación científica. En términos de las aplicaciones en biología molecular, los transposones han facilitado análisis de secuenciación (Haapa *et al.*, 1999; Chao *et al.*, 2016), detección de polimorfismos (Orsini *et al.*, 2007) y una precisa determinación de interacciones proteicas (Pajunen *et al.*, 2007). En el campo de la ingeniería de proteínas, los transposones han sido usados básicamente para generar proteínas truncadas con el fin de caracterizar actividades enzimáticas diferenciales (Poussu *et al.*, 2005). A nivel genómico, dichos transposones han sido empleados en procesos de mutagénesis y transgénesis enfocados a reprimir, disminuir o incrementar la expresión funcional de genes en diferentes organismos como virus (Vilen *et al.*, 2003), vertebrados (Miskey *et al.*, 2005) y bacterias (Akhverdyan *et al.*, 2011; Martínez-García *et al.*, 2014).

1.1.2 Transposones Mu

Actualmente, una de las maquinarias de transposición mejor caracterizadas es la de los transposones de tipo Mu. Originalmente provenientes del bacteriófago que lleva el mismo nombre, este sistema ha sido ampliamente estudiado y se ha usado para el diseño de herramientas basadas en transposones ya que su funcionamiento *in vitro* es relativamente sencillo, e incluso la enzima principal en la reacción se encuentra disponible comercialmente. Esta enzima de 86 kDa llamada transposasa MuA, hace parte de la llamada familia transposasas DDE, ya

que su centro catalítico consiste en una triada de dos ácidos aspárticos y un ácido glutámico, responsables del corte del transposón en las secuencias de reconocimiento y la inserción en el sitio diana. Cuenta además en su dominio amino-terminal con un sitio de unión a ADN y en el carboxi-terminal una región para interacción proteína-proteína (figura 2a) (Nesmelova & Hackett, 2010).

Gracias a esta conformación, para su funcionamiento los transposones Mu forman cuatro monómeros de MuA que se unen específicamente a seis sitios de reconocimiento, tres en cada extremo del transposón Mu. Cuatro de estos monómeros forman un tetrámero estable, que forman un complejo sináptico o transpososoma con los extremos del transposón e interactúan con los sitios de corte. De esta manera, el transposón es escindido desde el ADN donador, y mediante la misma actividad transferasa, es insertado en el ADN blanco (figura 2b) (Harshey & Jayaram, 2006). En contraste con la relativa complejidad del mecanismo de transposición *in vivo* para este fago, que involucra un número importante de factores auxiliares, se ha observado una simplicidad sustancial de las condiciones con el fin de realizar reacciones *in vitro* de transposición (Haapa-Paananen *et al.*, 2002).

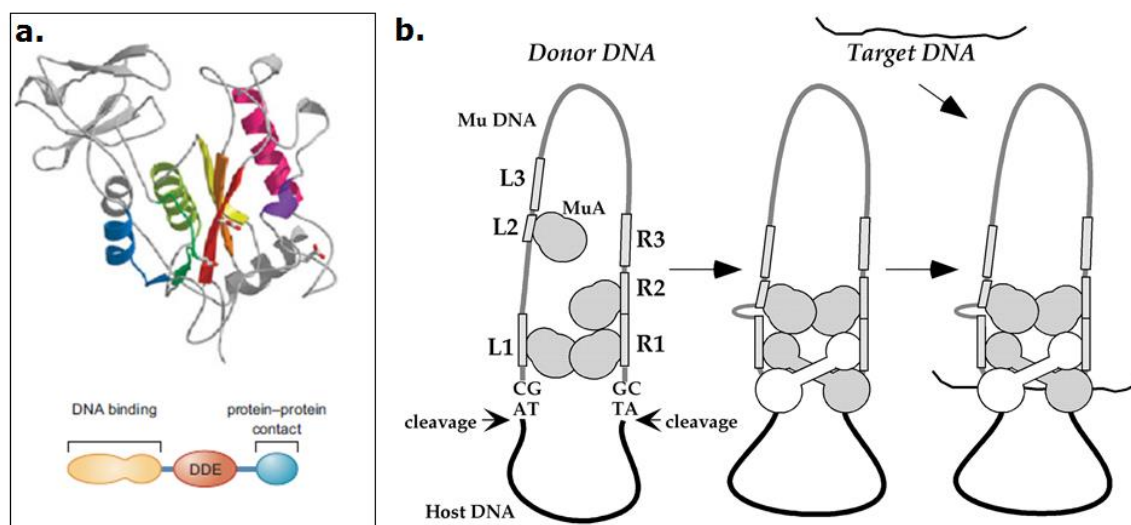


Figura 2. a. Estructura tridimensional y diagrama de la transposasa MuA (Rice & Kiyoshi, 1995); PDB ID: 1BCO. Tomado de Watson *et al.*, 2014. **b.** Mecanismo de acción de un transposón tipo Mu. Descripción en el texto. Tomado de Goldhaber-Gordon *et al.*, 2002.

De esta forma, los componentes mínimos para una reacción de transposición de tipo Mu incluyen el buffer de reacción, la enzima transposasa MuA, el transposón Mu y el ADN de interés o secuencia sobre la cual se insertará el transposón. Estos componentes han mostrado ser suficientes para lograr eventos de transposición eficientes con sesgos reducidos de inserción sobre múltiples moléculas de ADN de interés (Haapa *et al.*, 1999).

1.2 Metagenómica

El término metagenómica se refiere al análisis genómico, independiente de cultivo, de comunidades microbianas en un nicho ambiental particular. El término fue dado por Handelsman (1998) y se puede explicar a partir del concepto estadístico de “meta-análisis”: el proceso de combinar estadísticamente análisis separados, y “genómico”: el análisis del material genético de un organismo (Sabree *et al.*, 2009). En los años 90, cuando se pone en evidencia que las técnicas de cultivo tradicionales no eran capaces de aislar sino el 1% de la diversidad bacteriana en muchas muestras ambientales, se generó una gran expectativa para identificar esos organismos no cultivables y estudiar su potencial biotecnológico (Schloss & Handelsman, 2003). Sin embargo, uno de los objetivos planteados con el estudio metagenómico no era sólo identificar la diversidad microbiana y explorar su potencial biotecnológico, sino también comprender la composición de la comunidad y asignar un rol a la microbiota no cultivable de un nicho particular (Sharma *et al.*, 2008).

La metagenómica es una aproximación alternativa a los ensayos microbiológicos convencionales para el estudio de la diversidad microbiana del planeta. Esta estrategia se basa en la extracción directa del ADN de una muestra ambiental (conocido como el metagenoma) y su posterior estudio mediante (1) construcción de librerías almacenadas en bacterias fácilmente cultivables (ej. *E. coli*) (Rondon *et al.*, 2000) o (2) analizadas directamente por medio de tecnologías de hibridación y secuenciación masiva (Shendure & Ji, 2008).

En este sentido, la metagenómica representa una oportunidad para acceder, caracterizar y cuantificar la vasta mayoría de microorganismos desconocidos, así como de descubrir genes, rutas metabólicas y bioproductos novedosos con implementación potencial en biotecnología, biorremediación, farmacéutica, cosmética, entre otros campos (Schloss & Handelsman, 2003).

1.2.1 Análisis metagenómico basado en secuencia

La metagenómica basada en secuencia implica la secuenciación y el análisis del ADN a partir de muestras ambientales. Los estudios de metagenómica basados en secuencia se pueden llevar a cabo para ensamblar genomas, identificar genes, encontrar vías metabólicas completas y comparar organismos de diferentes comunidades (Sabree *et al.*, 2009).

Gracias al desarrollo de las técnicas de secuenciación de próxima generación (NGS por sus siglas en inglés, *Next Generation Sequencing*) ha sido posible estudiar y comprender el mundo de los microorganismos desde perspectivas más amplias. Los avances en metagenómica a través de NGS no solo han permitido una caracterización más precisa de los genomas bacterianos, sino que también han proporcionado una mejor identificación taxonómica de los microbiomas, así como una mayor capacidad de identificar genes y *clusters* biosintéticos mediante predicción *in silico* (Ferrer *et al.*, 2009).

Junto con la metagenómica, otras estrategias basadas en NGS, como la secuenciación del gen 16S rRNA y la metatranscriptómica han jugado un papel clave en la comprensión de las comunidades microbianas de diferentes ambientes y el papel que estas pueden llevar a cabo (Cao *et al.*, 2017).

Se puede decir que la mayor desventaja de la metagenómica basada en secuencia, es que sus análisis recaen totalmente en la comparación mediante bioinformática de las secuencias en estudio contra las bases de datos disponibles; por lo tanto, no es la estrategia más adecuada para la búsqueda e identificación de organismos y compuestos novedosos (Culligan *et al.*, 2014).

1.2.2 Análisis funcional sobre ADN metagenómico

Los análisis funcionales sobre librerías metagenómicas están basados en la expresión de genes foráneos por parte de un hospedero dado, con el fin de identificar nuevas funciones derivadas de genes conocidos o para identificar genes o familias de genes que expresan proteínas o metabolitos novedosos. En este caso la proteína, el compuesto o la función de interés son detectados a partir de un fenotipo en particular, los cuales son manifestados por algunos clones de la librería metagenómica. Esta aproximación ha sido ampliamente escogida en parte por ser una forma directa de identificación de funciones derivadas de genes individuales o de agrupaciones complejas de genes como operones o *clusters* de genes (Knight *et al.*, 2016).

El éxito de un ensayo funcional depende en gran medida del método de detección y de la actividad de interés. Actualmente se distinguen tres tipos generales de análisis: 1) Detección directa, donde la expresión de una proteína específica o metabolito es usada para identificar un fenotipo de interés en clones metagenómicos de forma directa sobre la colonia o su medio de cultivo; 2) Detección modulada, que involucra la expresión de genes esenciales para que el hospedero pueda crecer bajo condiciones selectivas; o 3) Inducción por sustrato, como una aproximación que promueve la expresión de genes en presencia de un sustrato específico. La detección exitosa de enzimas novedosas en librerías metagenómicas requiere una combinación apropiada de sustratos con el método de detección más idóneo para cada actividad de interés (Ekkers *et al.*, 2012).

A partir de los métodos de análisis actuales sobre las librerías de ADN metagenómico, se ha evidenciado el potencial de los diversos ambientes naturales de albergar funciones que posteriormente conllevan a la identificación de genes novedosos con relevancia en biotecnología. De esta forma, ha sido demostrada la importancia de la diversidad microbiana en el descubrimiento de enzimas con aplicación potencial para la industria, donde se destacan las carboxi-hidrolasas (esterasas, lipasas, lactamasas), enzimas de modificación de

polisacáridos (celulasas, alfa-amilasas, xilanasas), oxidoreductasas, dehidrogenasas, oxidasas y oxigenasas (Ferrer *et al.*, 2009; Coughlan *et al.*, 2015).

La metagenómica funcional también ha sido considerada una fuente promisoría de compuestos con relevancia clínica, lo que ha fomentado la caracterización de compuestos con potencial uso para el tratamiento de diabetes, cáncer y enfermedades infecciosas, entre otras (Altermann *et al.*, 2015; Lefevre *et al.*, 2008; Singh & Macdonald, 2010). Sin embargo, es en la búsqueda de genes responsables de resistencia microbiana donde actualmente se están concentrando los estudios basados en metagenómica funcional, ya que permite la identificación de genes novedosos y que por lo tanto no se encuentran en las bases de datos (Adu-Oppong *et al.*, 2017).

A pesar de las ventajas de la metagenómica funcional en la búsqueda de biocompuestos de interés, esta enfrenta varios retos, entre ellos: (1) la dificultad de crear librerías con grandes fragmentos que deben contener genes, operones o cassettes completos para su posterior expresión y (2) la baja tasa de expresión de genes foráneos por parte del microorganismo hospedero (Mullany, 2014).

1.3 Microorganismos empleados como hospederos de librerías metagenómicas

1.3.1 La bacteria *E. coli* como sistema de expresión

La bacteria *E. coli* es actualmente el hospedero preferido para la construcción y análisis de las librerías metagenómicas; pero debido a que los metagenomas son mezclas complejas de genomas derivados de un amplio rango de microorganismos, la maquinaria genética de *E. coli* puede ser incapaz de procesar correctamente los genes asociados a la mayor fracción de actividades codificados en el ADN foráneo (Uchiyama & Miyazaki, 2009). En análisis predictivos enfocados a cuantificar la probabilidad de *E. coli* de expresar genes localizados al interior de insertos de ADN para distintos microorganismos

procariontes, se evidenció que en promedio solo el 40% de dichos genes son accesibles a las maquinarias transcripcionales y traduccionales del hospedero. Por lo tanto, una fracción importante de genes (27-93%) es aparentemente invisible para la bacteria, por lo que su detección jamás se llevará a cabo sin importar la sensibilidad del método de detección a ser usado (Gabor *et al.*, 2004).

Esto fue además corroborado en ensayos experimentales en los que solo la mitad o una fracción reducida de todos los genes asociados a genomas de otras bacterias, como fue el caso de *Haemophilus influenzae* y *Pseudomonas aeruginosa*, respectivamente, pudieron ser reconocidos por *E. coli* (a nivel de transcripción). Además, fue evidente que aquellos genes que exhibieron los niveles más altos de transcripción en *E. coli* presentaron principalmente regiones promotoras similares a los sitios de reconocimiento por la subunidad sigma-70 de la ARN polimerasa bacteriana, resaltando la selectividad de la maquinaria transcripcional del hospedero durante los primeros pasos de la expresión de ADN foráneo (Warren *et al.*, 2008).

A nivel de la traducción a proteínas, el uso en el sesgo de codones ha sido frecuentemente considerado uno de los factores principalmente involucrados en la expresión ineficiente de proteínas en *E. coli*, debido a diferencias en la frecuencia de los distintos codones del ADN foráneo, con relación a la disponibilidad de todos los ARNs de transferencia (ARNts) del hospedero bacteriano (Welch *et al.*, 2009). Sin embargo, este paradigma ha sido ampliamente discutido en los últimos años, ya que se ha evidenciado que el uso de codones ha mostrado estar asociado mayoritariamente a la generación de estructuras secundarias altamente estables al extremo 5-prima de las hebras de ARNm naciente, que pueden interferir significativamente con el comienzo de la traducción (Kudla *et al.*, 2009). Otras aproximaciones han mostrado que la eficiente expresión de proteínas en *E. coli* está asociada a los niveles de los ARNts en el hospedero, pero específicamente a la disponibilidad de los ARNts que están cargados con sus respectivos aminoácidos y no a los niveles totales (Welch *et al.*, 2009).

Una vez se ha iniciado exitosamente la síntesis de una proteína, su plegamiento adecuado es indispensable para conferirle función adecuada. Este proceso es controlado en *E. coli* por factores tales como un nivel balanceado de expresión proteica, la presencia de enzimas apropiadas de modificación y la acción de chaperonas, que en muchos casos no son co-expresadas por el hospedero (Sørensen & Mortensen, 2005).

1.3.2 Hospederos alternativos de librerías de ADN

El uso de diferentes hospederos, ya sea que las librerías de ADN se construyan simultáneamente en varios de ellos o que sea transferida de un hospedero a otro, han mostrado ser útiles para incrementar la expresión heteróloga de genes de ADN metagenómico (Gabor *et al.*, 2007). Además, el usar microorganismos propios de los ambientes bajo estudio para la construcción de las librerías metagenómicas puede incrementar el éxito de un ensayo funcional particular. Por ejemplo, se evidenció que múltiples especies del género *Streptomyces*, comúnmente encontradas en muestras de suelos, fueron genéticamente estables para producir rangos diversos de metabolitos secundarios de relevancia clínica, derivados de librerías genómicas y metagenómicas; mientras que ninguno de dichos metabolitos había sido detectado al evaluar las librerías de ADN en *E. coli* (McMahon *et al.*, 2012; Kipchirchir *et al.*, 2017).

Otro ejemplo de uso de distintos hospederos bacterianos para evaluar el favorecimiento en la expresión funcional fue realizado para determinar la producción de antibióticos, cambios en la morfología de colonias y detección de pigmentación. Para ello, el mismo ADN metagenómico fue independientemente introducido en *E. coli*, *P. putida*, *Burkholderia graminis*, *Caulobacter vibrioides*, *Ralstonia metallidurans* y *Agrobacterium tumefaciens*. Como resultado de los análisis funcionales se observaron diferencias en la expresión de genes por los distintos hospederos, aún para las especies bacterianas más relacionadas filogenéticamente (Craig *et al.*, 2010).

Otros hospederos usados para la construcción y análisis de librerías de ADN genómico y metagenómico han incluido a *Bacillus subtilis* (Dobrijevic *et al.*, 2013), *Rhizobium leguminosarum* (Li *et al.*, 2005) y *Thermus thermophilus* (Angelov *et al.*, 2009). En todos estos ensayos los hospederos alternativos mostraron perfiles de expresión diferentes a *E. coli*, generando un mayor número de clones positivos derivados de los ensayos funcionales en cada caso.

2. Antecedentes y Justificación

Aunque no son extensos los reportes de aproximaciones orientadas a mejorar la expresión funcional de genes provenientes de librerías de ADN (genómicas y metagenómicas), existen algunas herramientas basadas en el uso de transposones que parcialmente suplen esta categoría.

El transposón MuExpress fue desarrollado como una herramienta para superar la dificultad de transcribir genes localizados en insertos largos de ADN de librerías metagenómicas (Leggewie *et al.*, 2006). Este transposón incrementa el nivel de transcripción de los insertos de ADN al incluir en sus extremos regiones promotoras de tipo T7 y fue validado mediante su aplicación sobre una librería metagenómica empleada en la búsqueda de lipasas. Sin embargo, un análisis detallado sobre el diseño y construcción del transposón MuExpress reveló un error importante que vuelve inviable el reconocimiento de uno de sus dos promotores T7 por la T7 ARN Polimerasa del hospedero. Otro transposón reportado para llevar a cabo la inserción aleatoria de promotores T7, pero con base en un sistema de transposición de tipo Tn5, corresponde al EZ-Tn5 <T7/KAN-2> (Jung *et al.*, 2016). Sin embargo, ninguno de estos reporta suficiente evidencia experimental que asocie los eventos de inserción aleatoria de los respectivos transposones, con favorecimientos significativos en la expresión de proteínas. Adicionalmente, estos dos transposones dependen de hospederos bacterianos que expresan la T7 ARN Polimerasa (ej. *E. coli* BL21 DE3), lo que restringe su uso en ensayos funcionales con ADN metagenómico, ya que la

mayoría de los kits comerciales para la construcción de dichas librerías emplean cepas bacterianas diferentes (ej. *E. coli* EPI300).

Debido a las restricciones que aún persisten y la poca oferta en cuanto al uso de transposones en este campo, en un estudio previo, se desarrolló el transposón TnC_T7 (Mongui *et al.*, 2016). Este transposón de tipo Mu, favoreció la expresión funcional de diferentes genes reporteros en el contexto de ADN metagenómico en una variedad de cepas de *E. coli*. Aunque la validación del transposón TnC_T7, en el contexto del favorecimiento de expresión de genes albergados en librerías metagenómicas, ha servido para superar las limitaciones inherentes a la expresión de genes en *E. coli*, el uso de este transposón se ha limitado a análisis funcionales solamente a este hospedero bacteriano. Por lo tanto, se sugiere que el desarrollo de una nueva herramienta basada en la secuencia del transposón TnC_T7 permita ampliar su rango de acción a diferentes especies bacterianas, lo que conllevaría a una detección más eficiente de genes y funciones derivadas de la diversidad microbiana en estudios de metagenómica funcional.

3. Objetivos

3.1 Objetivo general

Evaluar el potencial de un transposón de tipo Mu para favorecer la expresión funcional de genes en ADN metagenómico desde distintos hospederos bacterianos usados como sistemas de expresión en biología molecular.

3.2 Objetivos específicos

- Diseñar computacionalmente la estructura de un transposón que pueda ser utilizado en un amplio rango de hospederos bacterianos.
- Construir el transposón y verificar su integridad en secuencia y capacidad de transposición *in vitro*.
- Determinar en diferentes hospederos bacterianos la capacidad del transposón de incrementar la expresión de genes presentes en ADN metagenómico.

4. Materiales y Métodos

4.1 Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento

Todos los experimentos realizados en este estudio se llevaron a cabo en el hospedero *E. coli* EPI300 o *E. coli* CC118 (Tabla 1). El crecimiento bacteriano se realizó en medio LB (Luria-Bertani) a 37 °C, con agitación a 180 rpm en los cultivos líquidos y adicionando los antibióticos ampicilina (100 µg/mL), kanamicina (50 µg/mL), gentamicina (10 µg/mL) y/o cloranfenicol (12,5 µg/mL) en los experimentos que lo requerían.

4.2 Plásmidos

Los plásmidos empleados y construidos durante el estudio están listados en la Tabla 1. Todos estos fueron extraídos a partir de cultivos en medio líquido empleando el kit QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN).

4.3 Diseño del transposón Mu_TnX

Con el objetivo de generar una nueva versión del transposón que promoviera la expresión funcional de genes en hospederos diferentes a *E. coli* y múltiples tipos de ADN episomal (plásmidos y fósmidos), se realizó un repositorio con todas las secuencias que se usaron previamente en la construcción del transposón TnC_T7 (Mongui *et al.*, 2016). Para el manejo y diseño de las secuencias de ácidos nucleicos se empleó el software SnapGene (GSL Biotech).

En primer lugar, se seleccionó un nuevo sistema de expresión génica: el sistema XylS-Pm, que ha sido reportado como un regulador de la expresión de genes en

un amplio rango de hospederos bacterianos (Gawin *et al.*, 2017). Este gen se obtuvo a partir de la colección estándar de plásmidos “*Standard European Vector Architecture*” SEVA, del Centro Nacional de Biotecnología en Madrid, España (Chavarría *et al.*, 2013; Martínez-García *et al.*, 2015).

Tabla 1. Cepas bacterianas y plásmidos usados en este estudio.

Cepa o plásmido	Características relevantes	Referencia o fuente
<i>E. coli</i> EPI300	Cepa usada para clonación. Hospedero de librería metagenómica. F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80dlacZΔM15 Δ lacX74 recA1 endA1 araD139 Δ(araleu)7697 galU galK λ- rpsL (StrR) nupG trfA dhfr	Lucigen Corporation
<i>E. coli</i> CC118	Hospedero de los plásmidos pSEVA. F- araD139 del(ara leu)7697 del(lacX74) phoA del(20) galE galK thi rpsE rpoB argE(Am) recAI OmpC+ OmpF+	Martínez-García <i>et al.</i> , 2014
<i>E. coli</i> DH5α	Cepa usada para clonación. F- endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG purB20 φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17(rK-mK+), λ-	Taylor <i>et al.</i> , 1993
<i>P. putida</i> KT2440	Cepa <i>wild type</i> ; derivada de mt-2 curada del plásmido TOL pWW0	Bagdasarian <i>et al.</i> , 1981
pUC57	Am ^R , LacZ. Vector de clonación	Genscript Inc.
pMu_Pacl-AvrII	Plantilla del transposón en pUC57. Km ^R , T7RNAPol, 2 promotores T7, una región para reconocimiento de la transposasa MuA	Este estudio
pMu_XylS-Pm	pMu_Pacl-AvrII con sistema XylS-Pm clonado	
pSEVA328	Cm ^R , XylS-Pm	Chavarría <i>et al.</i> , 2013
pSEVA637	Gm ^R , GFP sin promotor	

Para la estrategia de construcción, se partió de la síntesis parcial del transposón (Genscript Inc., Piscataway USA), que consistió en una secuencia de 4045 pb que contiene la primera región de reconocimiento para la transposasa MuA adyacente a un promotor T7, el gen codificante para la ARN polimerasa T7, un gen de resistencia a Kanamicina, sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción *Pacl* y *AvrII* para la clonación del casete de expresión XylS-Pm, y un sitio de reconocimiento para la enzima *Apal*, con el fin de realizar la clonación de la segunda región de reconocimiento de la transposasa MuA.

Se diseñaron iniciadores para la amplificación de XylS-Pm y para la amplificación de la segunda región de reconocimiento MuA y segundo promotor T7 (fragmento Mu-T7), así como para todas las pruebas confirmatorias. La lista de los

iniciadores empleados se encuentra en la Tabla 2. Todos los iniciadores fueron diseñados con el software SnapGene (GSL Biotech), analizados mediante la herramienta OligoAnalyzer 3.0 (Integrated DNA Technologies) y sintetizados en Macrogen Inc. (Corea).

Tabla 2. Listado de iniciadores utilizados en este estudio.

Nombre	Secuencia (5'-3')	Uso
Pacl-F	CTTTAATTAAACGTTTCGTAATC	Amplificación fragmento 1 XylS-Pm
Pacl-R	ACGAGAAAAGTCAGATCTTC	
AvrII-F	GAAGATTTGACTTTTTCTCGTTCAATAAGCAAAAATCCATAGTTC	Amplificación fragmento 2 XylS-Pm
AvrII-R	GCCTAGGCATGGTCATGACTCCATTA	
Mu-T7-F	AATTCAGGAAGATCTGAAGC	Amplificación del fragmento Mu-T7
Mu-T7-R	CCAGTACTTAATACGACTCAC	
Mu-T7_Apal-F	TAGGGCCCAATTCAGGAAGATCTGAAGC	Adición de sitios <i>Apal</i> al fragmento Mu-T7
Mu-T7_Apal-R	TAGGGCCCCCAGTACTTAATACGACTCAC	
TnC_Sec_B	GCTGGCAATTCGGTTC	Confirmación mediante PCR y secuenciación Sanger
XylS_Int	GATTGATAAAGCCATCGAG	
M13-F	GTAAAACGACGGCCAGT	
M13-R	CCAGTACTTAATACGACTCAC	

4.4 Construcción y purificación del transposón

La secuencia de partida (plantilla) del transposón fue construida mediante síntesis química por parte del proveedor Genscript; esta secuencia de ADN se obtuvo clonada en el vector pUC57 (plásmido pMu_Pacl-AvrII).

La segunda parte consistió en la clonación de la secuencia correspondiente al sistema XylS-Pm, la cual fue obtenida empleando como molde el plásmido pSEVA328 de la colección SEVA, conservando en los extremos los sitios de restricción *Pacl* y *AvrII* (presentes en el plásmido). Dos reacciones de PCR fueron necesarias para obtener dos fragmentos de 967 y 1057 pb bajo las siguientes

condiciones de reacción (25 μ L): 5 μ L Buffer Q5 5X (New England Biolabs), 0,75 μ L de dNTPs (10 mM), 2 μ L de iniciadores *forward* y *reverse* (10 μ M), 0,25 μ L de ADN polimerasa Q5 (enzima de alta fidelidad) y se completó la reacción con agua grado PCR. Las condiciones de la amplificación fueron: 5 min 95 °C; 30 ciclos de 30 s 95 °C, 30 s 59 °C (Fragmento 1) o 65 °C (Fragmento 2), 1 min 72 °C y 5 min de extensión final a 72 °C. Los productos obtenidos fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa y se purificaron con el kit *NucleoSpin Gel and PCR Clean-up* (Macherey Nagel). Posteriormente, los dos fragmentos fueron ensamblados mediante la estrategia SOEing PCR (Horton *et al.*, 2013) para generar el casete XylS-Pm completo. Para esto, se emplearon los iniciadores *Pacl-F* (*forward* del fragmento 1) y *AvrII-R* (*reverse* del fragmento 2) en las mismas condiciones anteriores de reacción de PCR corriendo el programa: 5 min 95 °C; 30 ciclos de 30 s 95 °C, 45 s 60 °C, 2 min 72 °C y 5 min de extensión final a 72 °C. El producto obtenido fue evaluado en electroforesis y purificado a partir de gel de agarosa empleando el mismo kit. Se comprobó la eliminación del sitio de restricción *BglII* mediante un ensayo de restricción con esta misma enzima (NEB).

Una vez obtenido el fragmento XylS-Pm completo, este fue digerido con las enzimas *Pacl* y *AvrII* (NEB) en una reacción de 20 μ L siguiendo el protocolo señalado. El producto digerido se purificó y posteriormente se llevó a cabo una ligación con ADN ligasa T4 (NEB) en el plásmido pMu_*Pacl-AvrII* previamente cortado con las mismas enzimas de restricción y purificado a partir de gel. El producto de la reacción de ligación fue transformado mediante electroporación en células competentes de *E. coli* EPI300 y la siembra en placas de LB con ampicilina y kanamicina como marcadores de selección. Como control de la transformación se empleó solo el plásmido digerido. Los clones obtenidos fueron analizados mediante PCR de colonia, patrones de restricción y secuenciación Sanger, con el fin de confirmar la presencia y orientación de los insertos clonados en el nuevo plásmido denominado pMu_*XylS-Pm*. Los análisis y alineamientos de

las secuencias obtenidas se realizaron empleando el software *Geneious* (Kearse *et al.*, 2012).

Se seleccionó uno de los clones con un correcto análisis de secuencia para la extracción del plásmido pMu_XylS-Pm, con el fin de proseguir con la siguiente etapa en el proceso de construcción.

La misma estrategia descrita en el paso anterior fue empleada para la obtención y clonación de la segunda región MuA y promotor T7 (Mu-T7) en el sitio de restricción *Apal* del plásmido pMu_XylS-Pm. Para ello, se realizó la amplificación de dicha secuencia a partir de la primera región de reconocimiento MuA ya localizada en el plásmido pMu_Pacl-AvrII con los iniciadores Tn_F y Tn_R bajo las siguientes condiciones de reacción (25 μ L): 5 μ L Buffer Q5 5X (New England Biolabs), 0,75 μ L de dNTPs (10 mM), 2 μ L de iniciadores *forward* y *reverse* (10 μ M), 0,25 μ L de ADN polimerasa Q5 y se completó la reacción con agua grado PCR. Las condiciones de la amplificación fueron: 5 min 95 °C; 30 ciclos de 30 s 95 °C, 30 s 60 °C, 30s 72 °C y 5 min de extensión final a 72 °C. A este producto se le adicionaron sitios de restricción *Apal* con los iniciadores Mu-T7-*Apal*-F y Mu-T7-*Apal*-R, en las mismas condiciones de la anterior PCR. El producto de PCR fue purificado y digerido con la enzima *Apal* y clonado en el plásmido pMu_XylS-Pm previamente digerido con la misma enzima y desfosforilado con la enzima fosfatasa alcalina (NEB). Se seleccionaron múltiples clones para confirmación de la clonación mediante PCR y secuenciación Sanger. La clonación exitosa de este último fragmento aseguraría la obtención final del transposón Mu_TnX clonado en el vector pUC57.

Una segunda estrategia para la obtención del transposón Mu_TnX fue llevada a cabo. En esta, se obtuvo todo el transposón mediante PCR empleando como molde la reacción de ligación del plásmido pMu_TnX_XylS-Pm y el fragmento Mu-T7_Apal. Se empleó únicamente el iniciador Mu-T7-F que al anillar en la secuencia de reconocimiento de MuA, funciona como iniciador *forward* y *reverse*. Cada reacción de esta PCR se realizó en un volumen de 25 μ L, incluyendo los

siguientes componentes: 5 μL de 5X *Hot FirePol Blend Master Mix* (Solis Biodyne), 2 μL de iniciador Mu-T7-F (10 μM), 2 μL de producto de ligación y se completó con agua grado PCR. Las condiciones de la amplificación fueron: 12 min 95 °C (*Hot Start*); 30 ciclos de 30 s 95 °C, 30 s 59 °C, 4 min 72 °C y 10 min de extensión final a 72 °C. El producto obtenido de varias reacciones se combinó y se corrió en electroforesis para verificación y purificación a partir de gel con el kit *QIAQuick Gel Extraction* (QIAGEN). El amplicón esperado se purificó empleando perlas magnéticas AMPure XP (Beckman Coulter) en una relación de 0,7X con el fin de eliminar los fragmentos pequeños o dímeros de iniciadores, y finalmente se cuantificó su concentración obtenida mediante espectrofotometría (Nanodrop 2000, ThermoFisher).

4.5 Validación de funcionamiento del transposón

Se llevó a cabo un ensayo de transposición *in vitro* sobre el plásmido pSEVA637 como control de actividad. Este plásmido contiene el gen codificante para la proteína verde fluorescente (GFP) sin promotor. Se realizaron reacciones en un volumen de 10 μL que contenían 60 ng de Mu_TnX purificado, 200 ng del plásmido pSEVA637 (ADN objetivo), buffer de transposición 5X y 0,11 μg de enzima transposasa MuA (Thermo Fisher). Esta mezcla fue incubada durante 3 h a 30 °C y luego a 70 °C por 15 min para inactivación de la enzima. Paralelamente, se realizó una reacción como control negativo, incluyendo todos los componentes antes mencionados a excepción de la transposasa MuA. Se tomaron 2 μL de la reacción y el control para transformación mediante electroporación en *E. coli* EPI300 y *Pseudomonas putida* KT2440, siguiendo el protocolo descrito por Martínez & de Lorenzo (2012) y se hicieron siembras por superficie en placas de LB más gentamicina, kanamicina y 3-metil benzoato (Sigma) 1 mM como inductor. Se realizó recuento de colonias y se seleccionaron clones positivos y negativos para expresión de GFP. Posteriormente, se cultivaron algunos de estos clones en medio líquido para medición de fluorescencia en el lector TECAN GENios a una longitud de onda de excitación de 360 nm y emisión a 535 nm en

placas de 96 pozos negras (Greiner). Las diferencias entre muestras y controles fueron establecidas mediante análisis de varianza de una vía con el método Holm-Sidak a un nivel de significancia de 0,05.

4.6 Ensayo sobre librerías metagenómicas

Se llevó a cabo la reactivación de clones de una librería metagenómica construida en un estudio anterior para la búsqueda de genes de resistencia a arsénico (Latorre Ochoa, 2014) a partir de un número disponible de 15 mil clones. Se sembraron en agar LB con cloranfenicol y 0,2% de L-arabinosa, siendo este último el compuesto inductor de la replicación del fósido pCC2FOS (Epicentre) en el cual se había construido la librería. Los clones recuperados fueron combinados en 2 grupos (pooles) y cultivados en caldo LB para la extracción de los fósidos.

Las reacciones de transposición se llevaron a cabo de igual manera que en la prueba de funcionalidad, pero empleando en este caso 500 ng de ADN objetivo por reacción y control. Los productos de las reacciones fueron transformados en las mismas condiciones anteriormente descritas. Para la selección de clones, se realizaron siembras en placas de LB con cloranfenicol, kanamicina y 3-metil benzoato 1 mM. En un intento de replicar las condiciones del estudio original en la búsqueda de genes de resistencia a arsénico se adicionó arsenato de calcio como fuente de este elemento, a concentraciones de 20 y 50 mM.

5. Resultados y Discusión

A continuación, se presentan los resultados obtenidos para el desarrollo de un transposón desde su diseño en secuencia y funcionamiento teórico, su ensamblaje y los ensayos llevados a cabo para evaluar su funcionamiento en el laboratorio como una herramienta genética con la capacidad de aumentar la expresión de genes inactivos en ADN episomal (como plásmidos y fósmidos).

5.1 Diseño del transposón

Como se mencionó anteriormente, para el presente estudio se propuso el diseño de una herramienta basada en la secuencia del transposón TnC_T7 (Mongui *et al.*, 2016), con el propósito de ampliar el rango de posibles hospederos compatibles para su uso. En su diseño final, el transposón que fue nombrado Mu_TnX tiene una secuencia de 6123 pb y está formado por las siguientes partes:

En sus extremos se localizan las secuencias repetitivas invertidas Mu R1-R2 (54 pb) de reconocimiento para la transposasa MuA, ya que se ha demostrado que *in vitro*, esta forma más sencilla de repeticiones terminales invertidas es suficiente para que la transposasa forme un tetrámero activo que se une a la secuencia de ADN para formar un transpososoma y llevar a cabo el corte e inserción del elemento transponible (Harshey, 2014). Junto a estas regiones, la secuencia de Mu_TnX posee sitios de restricción *Bgl*II ya que se ha reportado que un pre-corte

de los transposones tipo Mu con estas enzimas permite aumentar la eficiencia en los eventos de transposición (Haapa-Paananen *et al.*, 2002).

En segundo lugar, se incluyen las secuencias correspondientes al casete de expresión XylS-Pm. Este es un sistema de regulación positiva proveniente originalmente de un plásmido de *Pseudomonas* en una ruta para la degradación de hidrocarburos aromáticos. Para su funcionamiento, compuestos derivados benzoicos (p.ej. 3-metil benzoato) deben ingresar mediante difusión pasiva a la célula, estos se unen al gen codificante para la proteína XylS, la cual, al ser producida, se une en forma de dímero al promotor Pm, dando lugar a la transcripción de los genes que se encuentren corriente abajo de este mediante una ARN polimerasa dependiente de los factores σ^{32} o σ^{38} de acuerdo con la fase de crecimiento bacteriano. Se cree además que su compatibilidad con estos diferentes factores sigma de la ARN polimerasa, permite que este sistema sea reconocido por diferentes hospederos bacterianos (Gawin *et al.*, 2017).

En tercer lugar, se incluyó en el diseño la secuencia completa del gen codificante para la T7 ARN polimerasa. Esta enzima de 99 kDa, es una polimerasa de una sola subunidad proveniente del bacteriófago T7 y tiene una alta especificidad hacia las regiones promotoras T7, que son secuencias de 23 pb reconocidas por la enzima para iniciar la transcripción. Este sistema polimerasa – promotor, ha sido empleado en una variedad de vectores para la expresión heteróloga de genes (Sousa & Mukherjee, 2003; Tabor, 2001). Se incluyeron dos promotores T7 en los extremos de Mu_TnX, de forma bidireccional para poder inducir la transcripción de genes corriente arriba o abajo del sitio de inserción del transposón.

Por último, se incluye un marcador de selección mediante la resistencia a kanamicina, correspondiente a un gen codificante para una kanamicina quinasa que inhibe aminoglicósidos como la kanamicina o neomicina.

Con este diseño final, se pretendió que Mu_TnX sea empleado en reacciones *in vitro* y posteriormente transformado en diferentes hospederos bacterianos. Mediante la adición de 3-metil benzoato en el medio de cultivo, se induciría la expresión de XylS, activando el promotor Pm para expresar así la T7 ARN polimerasa, que reconocería los promotores T7 para así finalmente dar lugar a la expresión de genes presentes en el ADN objetivo (Figura 3).

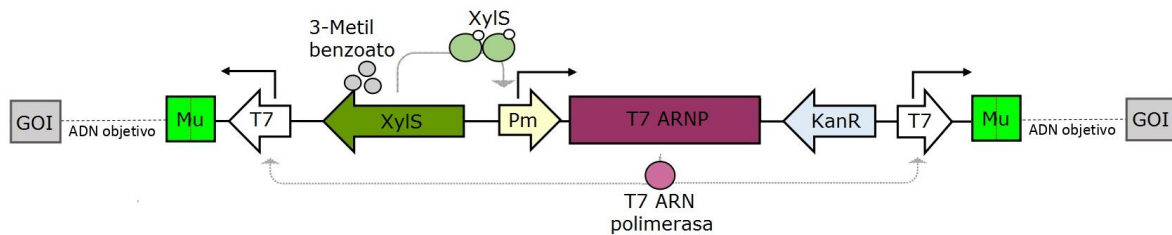


Figura 3. Estructura y funcionamiento teórico del transposón Mu_TnX. Se diferencian las partes que lo conforman: las regiones Mu R1-R2 de reconocimiento para la transposasa MuA (verde fluorescente), se incluye la secuencia correspondiente al gen XylS (verde), que al ser inducido mediante 3-metil benzoato, produce la proteína XylS, que en forma de dímero activa el promotor Pm (beige) para dar lugar a la transcripción del gen codificante para la T7 ARN polimerasa (violeta). La polimerasa producida se une específicamente a los promotores T7 (blanco), que se incluyen bidireccionalmente para poder inducir la transcripción de genes de interés (GOI) corriente arriba o abajo del sitio de inserción del transposón. Se incluye un marcador de selección de resistencia a kanamicina KanR (azul claro).

Al comparar el diseño del transposón Mu_TnX con su antecesor TnC_T7, se consideró que el desarrollo de esta nueva herramienta podría permitir la aplicación de este sistema en diferentes especies bacterianas debido principalmente a la inclusión del sistema regulador de la expresión génica XylS-Pm, compatible con diversos hospederos como *E. coli*, *P. aeruginosa*, *P. putida*, *P. fluorescens*, *Xanthomonas campestris* y *Azotobacter vinelandii* (Gawin *et al.*, 2017; 2019). Este sistema permite además llevar a cabo una regulación alta o baja de acuerdo con la concentración de inductor empleada, con la ventaja del uso de inductores de bajo costo (Brautaset *et al.*, 2009). De esta manera, se complementará la alta especificidad y procesividad de la T7 ARN polimerasa (Tabor, 2001) con las ventajas de un sistema de expresión versátil como XylS-Pm para promover la expresión de genes inactivos en ADN episomal, como los plásmidos y los fósidos en el contexto de estudios de genómica y metagenómica funcional.

5.2 Ensamblaje y purificación de Mu_TnX

5.2.1 Estrategia de construcción

Una vez definida la estructura del transposón, y ajustándose a las condiciones disponibles para su obtención y ensamblaje; se definió una estrategia de construcción en tres fases: una primera en la que mediante contratación de síntesis de ADN se obtendría una secuencia plantilla con la mayor parte de componentes a excepción del sistema de expresión y la segunda región de reconocimiento Mu R1-R2 y promotor T7 (fragmento Mu-T7) (Secuencia en Anexo 1). Se incluyeron en la secuencia plantilla sitios de restricción para la posterior clonación de las dos regiones faltantes. En el caso del sistema de expresión, se incluyeron sitios para las enzimas *PacI* y *AvrII*, compatibles con la colección SEVA. Finalmente, se clonaría el fragmento Mu-T7 en un único sitio de restricción *ApaI* (Figura 4).

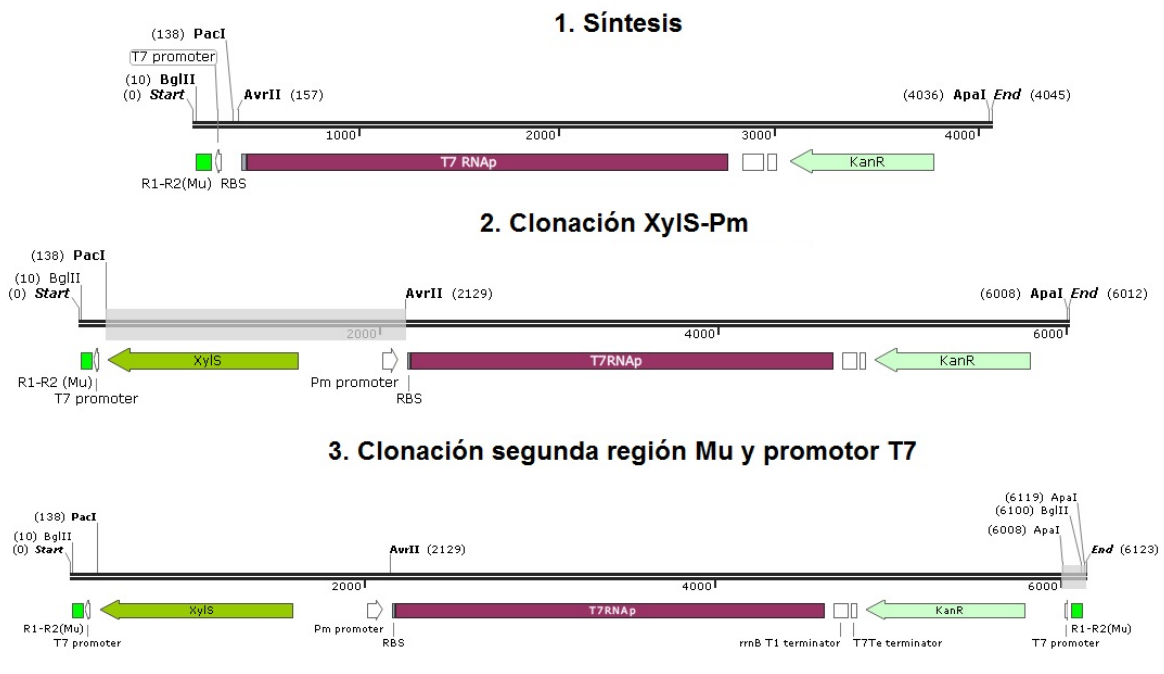


Figura 4. Estrategia planteada para la construcción de Mu_TnX. Se sintetizó una plantilla (paso 1) con el fin de clonar posteriormente el casete XylS-Pm en los sitios de restricción *PacI* y *AvrII* (paso 2). Finalmente, la clonación del fragmento Mu_T7 se realizó en el sitio de restricción *ApaI* (paso 3). Durante todo el proceso, la construcción del transposón se realizó en el vector pUC57 (ver mapas completos en el Anexo 2).

5.2.2 Obtención del casete XylS-Pm

En el inicio del proceso de construcción, paralelamente a la síntesis de la secuencia plantilla, se llevó a cabo la obtención del casete XylS-Pm (2004 pb) en el contexto de la colección SEVA a partir del plásmido pSEVA328. En este proceso, se encontró que en la posición 930 del gen XylS había un sitio de corte *Bgl*II (AGATCTG), que coincidía con el sitio de restricción seleccionado para un pre-corte del transposón y liberación del vector de clonación. Por esta razón, para lo obtención del casete XylS-Pm fue necesaria la eliminación del sitio de corte *Bgl*II mediante la estrategia de SOEing PCR, en la cual la sustitución de la citosina por una timina modificaría el sitio de restricción, pero sin alterar el aminoácido traducido a partir de su respectivo codón en el marco abierto de lectura de XylS-Pm. Por lo tanto, dicho procedimiento aseguraría generar la modificación necesaria en el ADN, al mismo tiempo que mantener intacta la estructura primaria de la proteína XylS (Figura 5).

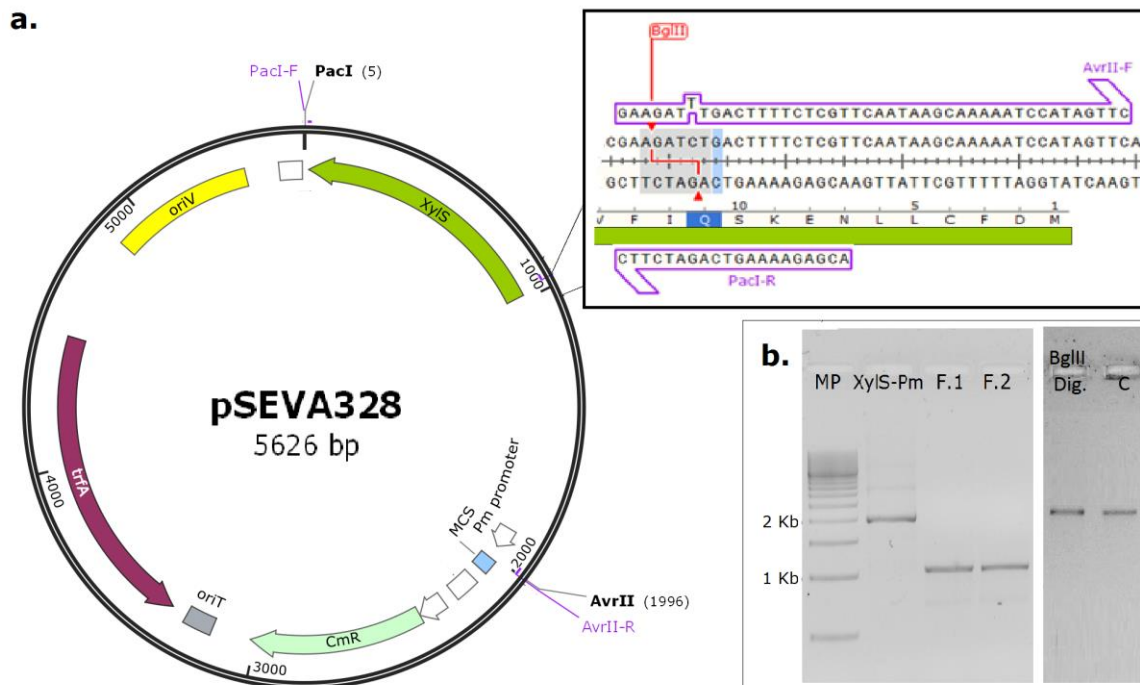


Figura 5. a. Diagrama del plásmido pSEVA328; se hace un acercamiento a la región en donde se encuentra el sitio *Bgl*II en el gen XylS, indicando la base (C → T) que se modificaría en el iniciador diseñado. **b.** Gel 1: Resultados de PCR y SOEing PCR para obtención y modificación del casete XylS-Pm. MP = Marcador de peso molecular; F.1 = Fragmento 1; F.2 = Fragmento 2. Gel 2: *Bgl*II Dig. = Producto XylS-Pm digerido con la enzima *Bgl*II; C = Control del producto sin digerir.

En este sentido, la estrategia de SOEing (por las siglas *Splicing by Overlapping Extension*) es un método basado en PCR que permite llevar a cabo procesos de recombinación y mutagénesis sobre secuencias específicas de ADN sin depender de sitios de restricción. Al modificar las secuencias incorporadas en los extremos 5' de los iniciadores, se puede hacer que el producto obtenido en la reacción final contenga las modificaciones deseadas, como sustituciones, deleciones o inserciones de uno o más nucleótidos (Horton *et al.*, 2013). Si bien el uso que se le dio al método en este estudio fue relativamente sencillo, la SOEing PCR es un enfoque técnicamente simple pero potente, que sigue siendo empleado para sintetizar genes que codifican proteínas recombinantes con modificaciones importantes (Schwentner *et al.*, 2019), o secuencias modificadas para mutagénesis dirigida a nivel genómico (Li *et al.*, 2019), o incluso para generar fragmentos de ADN para inserción de modificaciones en genes específicos con herramientas más novedosas como CRISPR/Cas9 (Price *et al.*, 2019)

5.2.3 Síntesis de plantilla y clonación XylS-Pm

Como se mencionó anteriormente, la estrategia de sintetizar una plantilla de ADN con partes fundamentales como son el gen codificante de la ARN polimerasa T7 y sus promotores, el gen de resistencia a kanamicina y sitios de restricción para las enzimas *PacI* y *AvrII* obedece a la idea de hacer del transposón una herramienta modular, y que en su secuencia se pueda incluir no únicamente el sistema XylS-Pm, sino cualquier sistema de expresión disponible en la colección de plásmidos SEVA. Esta plataforma para el manejo de plásmidos, tal como otras estrategias existentes en biología sintética, busca estandarizar el diseño y ensamblaje de plásmidos con una serie de genes como marcadores de selección, orígenes de replicación y genes denominados “cargos” que confieren funcionalidad al plásmido (sistemas de expresión, genes reporteros, sitios de múltiple clonación). En conjunto, esta plataforma facilita la elección de vectores para aplicaciones específicas, de tal manera que el usuario pueda decidir fácilmente la mejor configuración posible (Chavarría *et al.*, 2013; Martínez-García *et al.*, 2015).

Una vez recibida la secuencia plantilla por parte del proveedor de este servicio (Anexo 2), esta fue empleada como vector para la clonación del producto XylS-Pm obtenido en el paso anterior. Los clones obtenidos fueron analizados inicialmente mediante PCR de colonias empleando un iniciador del vector (M13-F) y uno del inserto (*PacI*-R), esperando un fragmento de 1100 pb aproximadamente. De 18 colonias analizadas, la mayoría fueron positivas (Figura 6) y, por lo tanto, se prosiguió con la selección de algunas de estas para verificación mediante secuenciación Sanger. Se extrajeron entonces los plásmidos de varias colonias y se secuenciaron con tres iniciadores debido al tamaño grande del inserto. Una vez ensambladas las secuencias obtenidas y alineadas contra la secuencia teórica, se observó que 4 clones tenían la secuencia esperada, incluyendo la sustitución introducida de una T en lugar de C, reconfirmando así la efectividad del método empleado para la modificación necesaria en la secuencia del gen XylS (Figura 6).

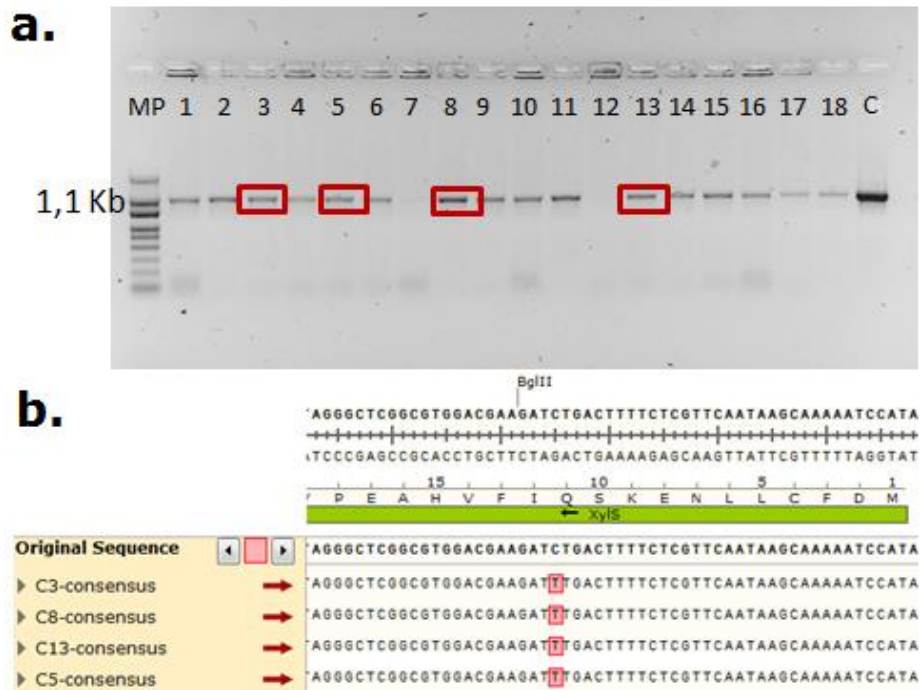


Figura 6. a. Resultado de PCR de colonias positivas para la clonación de XylS-Pm. 1 - 18 = Clones evaluados; MP = Marcador de Peso Molecular (1500 pb); C = Control de PCR sobre el plásmido pSEVA238. Se señalan en recuadro rojo muestras seleccionadas para secuenciación. **b.** Alineamiento de secuencias de los clones evaluados. Las bases resaltadas en rojo indican que la sustitución de la C por T del sitio *BglII* fue efectiva y se mantuvo en todos los clones evaluados. Ver el alineamiento completo de la secuencia del clon seleccionado en el Anexo 3.

5.2.4 Clonación del fragmento Mu-T7

En la siguiente etapa, al llevar a cabo la clonación del fragmento Mu-T7 y evaluar los clones recuperados, se observó que todas las colonias recuperadas de la transformación resultaron positivas al realizar la confirmación por PCR confirmatoria. A pesar de esto, al realizar la verificación por secuenciación se evidenció que todos los clones presentaron la inserción en la dirección opuesta a la esperada, además de la presencia de inserciones de nucleótidos que no correspondían a la secuencia molde amplificada (Figura 7).



Figura 7. a. Resultado de PCR de colonias positivas para la construcción pMu_TnX_XylS-Pm más el fragmento Mu-T7. 1 - 18 = Clones evaluados; MP = Marcador de Peso Molecular (1500 pb); C = Control de PCR sobre el plásmido (vector) vacío. **b.** Alineamiento de algunas secuencias de los clones evaluados. Las bases resaltadas en rojo indican inserciones en las secuencias analizadas al comparar contra la secuencia esperada. Las flechas (azul/rojas) señalando a la izquierda, indican que los alineamientos están en dirección opuesta a la secuencia teórica contra la que se está comparando.

Pese a que se sustituyó la cepa de *E. coli* (EPI300 por DH5 α) empleada como hospedero para la clonación, se siguió observando el mismo resultado en todas las secuencias evaluadas. Debido a esto, y a pesar de los múltiples intentos de clonar mediante el protocolo establecido en el diseño inicial, con la estrategia empleada no fue posible llevar a cabo la clonación de esta secuencia necesaria para la acción de la enzima transposasa MuA y, por lo tanto, la posterior actividad del transposón.

Esta dificultad en la clonación del fragmento Mu-T7 mediante técnicas clásicas puede atribuirse a que la clonación de regiones repetitivas puede dar origen a mutaciones o recombinación al replicarse el ADN recombinante en la bacteria hospedera (Godiska *et al.*, 2010). Aunque se esperaba sobrellevar esa limitación mediante la amplificación de esta secuencia de reconocimiento para la transposasa MuA y clonación en un único sitio de restricción *ApaI* con 50% de posibilidad de inserción en la orientación esperada, en las colonias recuperadas y evaluadas no fue posible la identificación de clones con la secuencia en la orientación esperada.

5.2.5 Obtención de Mu_TnX mediante PCR

Debido a las razones mencionadas en el punto anterior, fue necesario definir otra estrategia para finalizar la construcción del transposón Mu_TnX. De esta manera, la técnica descrita en la metodología para la amplificación de toda la secuencia del transposón usando como molde el producto de ligación pMu_XylS-Pm más el fragmento Mu-T7 fue exitosa, obteniendo un amplicón con una longitud esperada de 6123 pb y comprobando, mediante secuencia, que el fragmento Mu-T7 se encuentra en la orientación adecuada (Figura 7).



Figura 7. a. Resultado de PCR del transposón Mu_TnX completo. MP= marcador de peso molecular. b. Alineamiento de la secuencia obtenida del producto de PCR contra la segunda región de promotor T7 y repetición invertida Mu en la secuencia teórica del transposón.

Una vez obtenido el transposón y verificada su correcta secuencia, se procedió a clonar el fragmento completo dentro de un plásmido con el fin de asegurar su almacenamiento y posterior obtención. Sin embargo, debido al gran tamaño de esta secuencia como inserto, no se pudieron obtener hasta la fecha clones

positivos que contengan el transposón. A pesar de esto, ya que se verificó por secuencia que el producto obtenido mediante PCR contiene todas las partes de acuerdo con el diseño teórico para su funcionamiento, se definió que cumple con las características necesarias para la evaluación funcional de este.

5.3 El transposón Mu_TnX promueve la expresión de GFP en diferentes hospederos

El ensayo de verificación del funcionamiento de Mu_TnX permitió comprobar la actividad *in vitro* de este transposón. En las condiciones de evaluación se obtuvieron más de mil colonias positivas para la transposición en *E. coli* (Figura 8a) y 372 en *P. putida* (Figura 8b), usando en el medio de cultivo los marcadores de selección para el plásmido objetivo y el transposón.

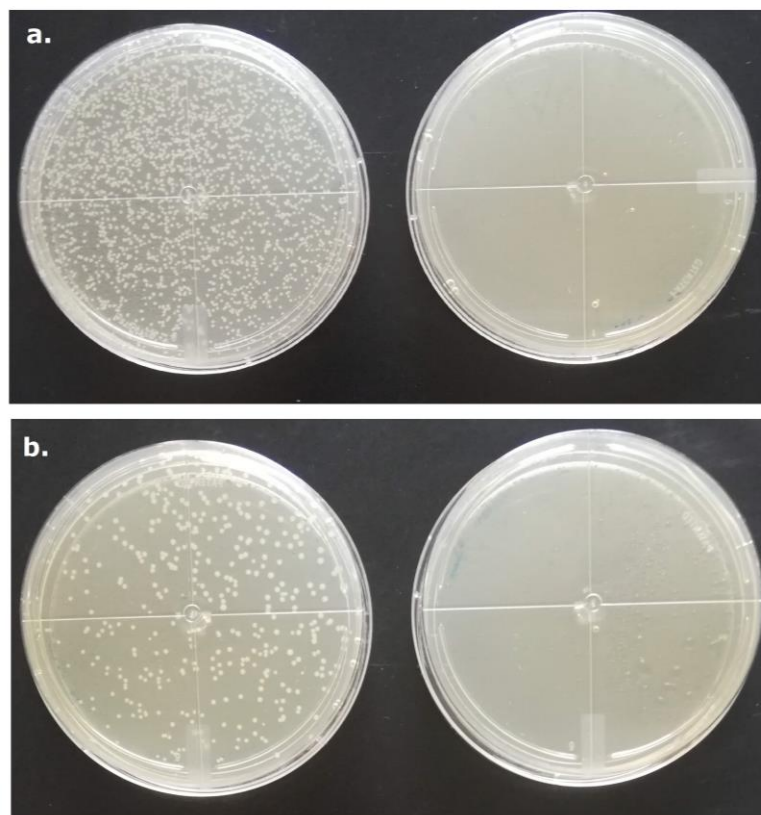


Figura 8. Colonias recuperadas de la transformación de la reacción de transposición de Mu_TnX en el plásmido pSEVA637 como ADN objetivo en **a.** *E. coli* TOP10 y **b.** *P. putida* KT2440. En cada caso se observó que al transformar el control de la reacción realizado sin transposasa MuA no se recuperaron colonias capaces de crecer con los antibióticos empleados para la selección.

Al comparar con los controles de reacción de transposición (sin enzima MuA), se confirma la capacidad de transposición de Mu_TnX *in vitro* y con una alta ocurrencia de eventos de transposición en las condiciones establecidas. Esto quiere decir que la relación de moléculas de transposón empleadas en la reacción (aproximadamente 9×10^9 copias) es suficiente para que haya eventos de transposición detectables sobre las moléculas de plásmido objetivo añadidas ($\sim 5 \times 10^{10}$). Teniendo en cuenta que para *E. coli* se utilizaron aproximadamente 26 ng de ADN presentes en 1 μ L de reacción de transposición y 52 ng en *P. putida*. Por lo tanto, estimando un tamaño de 9,5 Kb del plásmido resultante de pSEVA637 más Mu_TnX, se puede decir que tanto la reacción de transposición como la transformación tuvieron una alta eficiencia a pesar del gran tamaño del producto transformado.

A pesar del alto número de colonias recuperadas en placas de agar LB, que además de los antibióticos contenían el inductor de XylS, 3-metil benzoato, no fue evidente a simple vista la presencia de colonias que expresaran GFP, correspondiente a la proteína de 236 aminoácidos proveniente originalmente del cnidario *Aequoria victoria* (PDB ID: 1EMA). Debido a esto, fue necesario realizar repiques de colonias en nuevas placas en donde una mayor biomasa por cada colonia permitiría una mejor apreciación de la expresión de esta proteína fluorescente. De esta manera, se recuperaron colonias tanto de *E. coli* como de *P. putida* en las que se evidenció la expresión de GFP a partir del plásmido pSEVA637, cuyo evento se debió exclusivamente al evento de transposición y al favorecimiento en la transcripción desde el transposón Mu_TnX. De 50 colonias repicadas por cada cepa bacteriana se logró detectar cualitativamente la producción de GFP en dos colonias de *E. coli* y tres colonias de *P. putida*, como se observa en la Figura 9a.

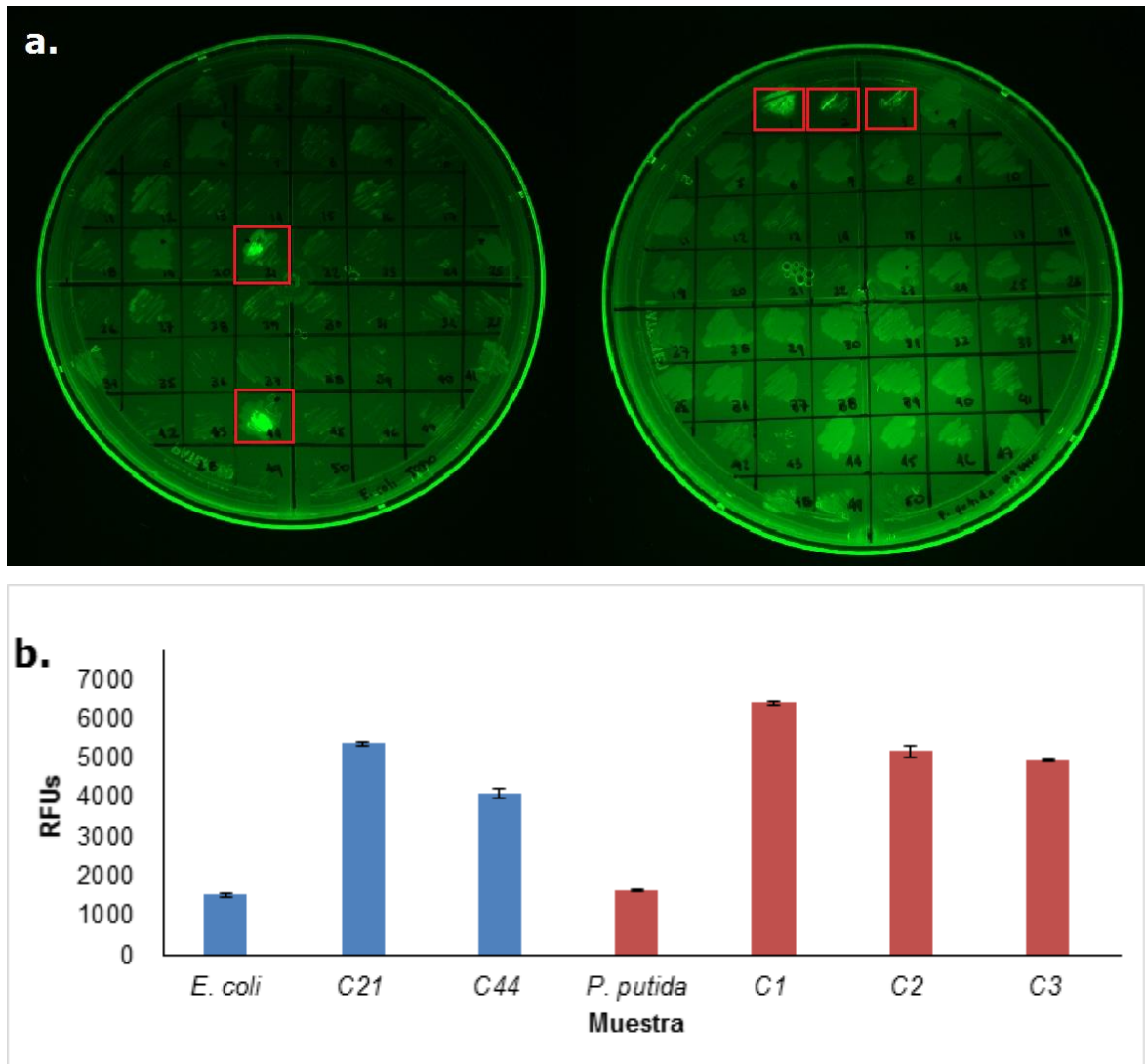


Figura 9. a. Repiques de clones de *E. coli* (izquierda) y *P. putida* (derecha) recuperados en la transformación de pSEVA637 más Mu_TnX. Las placas se expusieron a luz UV en un fotodocumentador GelDoc (Biorad). Se señalan en recuadro rojo las colonias que emiten fluorescencia. **b.** Medición de fluorescencia en colonias seleccionadas en medio líquido. Las mediciones se presentan en Unidades Relativas de Fluorescencia (RFU), dadas por el equipo GENios (TECAN) en el software magellan3 después de lectura a excitación de 360 nm y emisión a 535 nm. Las barras de error corresponden a desviación estándar calculada de la medición de tres réplicas técnicas.

El resultado observado en placas bajo exposición a la luz UV, fue confirmado mediante medición fluorométrica de los clones crecidos en medio líquido bajo las mismas condicione de cultivo. Al comparar los valores registrados en el equipo GENios se pudo observar una diferencia significativa ($p < 0,001$) entre la emisión

de fluorescencia de los clones y los valores de autofluorescencia registrados para los controles de *E. coli* y *P. putida* sin transformar (Figura 9b).

En este punto, el mapeo de las inserciones del transposón sobre el plásmido podría ayudar a explicar las diferentes intensidades de fluorescencia observadas en los clones evaluados. Esto se llevará a cabo mediante secuenciación Sanger en los plásmidos post transposición con el iniciador TnC_SeC_B (Tabla 2), lo que permitiría identificar mediante alineamiento con la secuencia del ADN objetivo, el sitio en el que ocurrió la transposición.

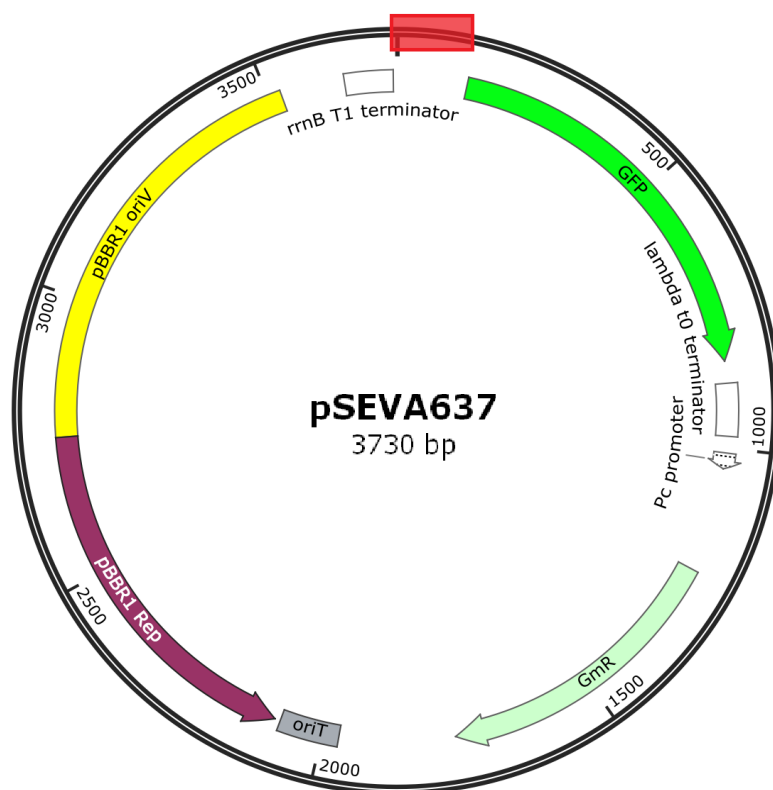


Figura 10. Mapa del plásmido pSEVA637 con el gen codificante para GFP sin promotor. Se señala en rojo la zona en donde, teóricamente, Mu_TnX permitiría inducir la expresión de la proteína GFP.

Esta baja tasa de clones que expresan la proteína se atribuye al hecho de que en el plásmido pSEVA637 sólo existe un espacio de aproximadamente 130 pb en el que el transposón puede insertarse corriente arriba a la secuencia de GFP sin alterar la secuencia de los otros genes que hacen parte del plásmido (Figura 10).

Esto sumado a la inserción aleatoria de un transposón tipo Mu, lo que quiere decir es que de todos los eventos de transposición de Mu_TnX sobre pSEVA637 ocurridos en la reacción llevada a cabo, solo unos pocos corresponden al transposón en la posición que permitiría que el promotor T7 tenga la capacidad de activar la expresión de GFP.

Hasta este punto, se comprobó que Mu_TnX es funcional en su capacidad de transposición y favorecimiento de expresión de genes en el contexto de un plásmido. Estos son resultados similares a los reportados en el desarrollo de los transposones Mu_Express (Leggewie *et al.*, 2006) y Mu_TnC (Mongui *et al.*, 2016), pero con la principal ventaja de que el transposón Mu_TnX puede emplearse en hospederos bacterianos diferentes a *E. coli*.

Finalmente, la evaluación de Mu_TnX sobre funciones diferentes a la expresión de un gen reportero como GFP daría mayor soporte a los resultados aquí obtenidos y podría permitir superar limitaciones en cuanto a la detección cualitativa del fenotipo deseado, a la sensibilidad y a la reproducibilidad de los métodos empleados para la cuantificación de fluorescencia.

5.4 Transposición de Mu_TnX en una librería metagenómica

En la reactivación de la librería metagenómica empleada para la búsqueda de genes de resistencia a Arsénico, únicamente fue posible la recuperación de aproximadamente 300 clones. A pesar de la baja cantidad de clones con respecto al total de la librería, se consideró la validez de este número para la prueba inicial de funcionamiento de Mu_TnX en el contexto de ADN metagenómico al comparar con otra herramienta similar en la que se evaluó un menor número de clones (Jung *et al.*, 2016).

Al evaluar la capacidad de transposición de Mu_TnX sobre la librería metagenómica, se evidenció una menor eficiencia que en el ensayo realizado

sobre plásmidos en las condiciones que se establecieron para el estudio. Si bien fue posible la recuperación de clones post-transposición capaces de crecer con los antibióticos empleados como marcador de selección (cloranfenicol para el fósforo pCC2FOS y kanamicina para Mu_TnX), su número fue bajo: 13 colonias para *E. coli* y 2 para *P. putida*. La ubicación de los sitios de transposición deberá ser identificada mediante secuenciación con el iniciador TnC_Sec_B.

En cuanto a la selección sobre medios de cultivo con arsenato de calcio, en las condiciones evaluadas no fue posible la detección de clones positivos en ninguno de los hospederos empleados. En este sentido, de acuerdo con los resultados obtenidos en el desarrollo de otros transposones, se requeriría analizar muchos más clones post-transposición para poder evidenciar el fenotipo esperado. Por ejemplo, en el caso de MuExpress que fue evaluado sobre 1700 cósmidos de una librería metagenómica, fue necesaria la recuperación de tres veces más clones post-transposición para poder recuperar un clon que exhibió la función evaluada (Leggewie *et al.*, 2006). Siguiendo este ejemplo, se cree entonces que para el ensayo llevado a cabo con Mu_TnX sobre 300 clones metagenómicos, lo ideal sería recuperar al menos 900 clones post-transposición para dar mayor validez a los análisis funcionales. Por lo tanto, es necesario solucionar la baja eficiencia de la transposición en este tipo de vectores, para lo que se deben evaluar variables en la reacción de transposición como cantidad de ADN objetivo, cantidad de transposón y tiempo de incubación.

En cuanto a la librería metagenómica empleada para esta evaluación y su posible papel en los resultados obtenidos, vale la pena mencionar que en el estudio original (Latorre Ochoa, 2014) en el que se construyó esta librería metagenómica, de aproximadamente 50 mil clones solo se identificaron 11 clones positivos, un número bastante bajo para la cantidad de clones obtenidos; ya que si se compara con estudios en metagenómica funcional en los que se empleó el mismo vector y hospedero, pero buscando otro tipo de funciones, el número de clones positivos fue mayor en la búsqueda de celulasas, proteasas y lipasas (Calderon *et al.*, 2019) y genes de resistencia a triclosán (Cameron *et al.*, 2019). De este modo, y

de acuerdo con lo mencionado por Latorre Ochoa (2014), es válido mencionar que la baja eficiencia puede deberse a que la presencia de este tipo de genes que confieren resistencia a arsénico es limitada con el sustrato empleado para el tamizaje funcional (ion arsenato), por lo cual, la poca actividad encontrada de reducción de este ion estuvo relacionada al tipo de selección funcional empleada.

En este sentido, se haría necesaria la evaluación funcional de esta librería metagenómica bajo un método diferente para la selección funcional de clones. La amplia diversidad genómica de esta función biológica sugiere que se deban emplear nuevos enfoques para la identificación específica de esta actividad para eventualmente poder comparar la capacidad real del transposón Mu_TnX sobre esta librería. De igual manera, la secuenciación total de todos los clones de la librería metagenómica daría una visión más general de la diversidad y abundancia de genes (activos y no activos) reportados en bases de datos relacionados con el metabolismo del arsénico. Mediante esta metodología se podría llegar a conocer la potencial presencia de microorganismos con esta función de interés, tal como se demostró en un estudio reciente sobre 38 metagenomas de suelos contaminados con este compuesto (Dunivin *et al.*, 2019). Esto sugeriría que el conocimiento previo de la presencia de genes de interés en una librería metagenómica sería útil en la etapa de validación de una herramienta como Mu_TnX, ya que se evidenciaría funcionalmente la presencia de estos genes sin necesidad de llevar a cabo la sub-clonación de estos en un hospedero.

Debido a estos resultados, se hace necesaria la optimización del uso de Mu_TnX para su uso sobre ADN fosmídico y de igual manera, evaluar la acción del transposón Mu_TnX sobre otras librerías metagenómicas que hayan sido empleadas para la búsqueda de genes bioactivos diferentes a la empleada en este estudio.

5.5 Relevancia de las herramientas para apoyar estudios de metagenómica funcional

A pesar del gran auge de los estudios metagenómicos basados en secuenciación masiva gracias al aumento de las capacidades en estas tecnologías, la metagenómica funcional sigue siendo la mejor estrategia para el descubrimiento de genes, enzimas y compuestos novedosos presentes en las comunidades microbianas de diversos ambientes (Adu-Oppong *et al.*, 2017).

Si bien las expectativas para el descubrimiento de nuevas moléculas bioactivas en metagenomas ha disminuido (basado en el menor número de publicaciones sobre este tema), en años recientes se siguen reportando nuevas enzimas como fosfatasas y fitasas (Castillo Villamizar *et al.*, 2019), oxigenasas (Nagayama *et al.*, 2015), lipasas y proteasas (Calderon *et al.*, 2019; Huo *et al.*, 2018) que han sido identificadas en estudios funcionales en metagenomas de diferentes ambientes, ya sea mediante detección directa o sub-clonación de los genes. Además, la metagenómica funcional sigue siendo el método de preferencia para la búsqueda de nuevos antimicrobianos y genes o clusters bioactivos que confieren resistencia a estos (Boolchandani & Dantas, 2017; Mullany, 2014). Todos estos estudios comparten el hecho de que, a partir de toda la información contenida en los metagenomas, solo lograron identificar un pequeño número de genes activos. Esto ocurre debido a que un metagenoma es una mezcla compleja de genomas de una amplia gama de microorganismos, y la maquinaria genética del hospedero que alberga las librerías metagenómicas es incapaz de reconocer y expresar con éxito la mayor fracción de genes extraños.

Entre las alternativas para mejorar los procesos de transcripción de genes extraños en librerías metagenómicas destaca el uso de promotores inducibles y bidireccionales en vectores de clonación como plásmidos, fósidos o cósmidos (Lämmle *et al.*, 2007; Lussier *et al.*, 2011). Sin embargo, en el caso de librerías metagenómicas construidas con fragmentos largos de ADN (> 30 kpbs), estos promotores solo son capaces de transcribir genes al principio y al final del inserto.

Como consecuencia, la transcripción de otros genes depende únicamente de la maquinaria del hospedero. Para superar este inconveniente, se han construido algunas librerías metagenómicas con insertos pequeños de ADN (<10 kbps), que al mismo tiempo aumentan las posibilidades de albergar genes truncados o grupos incompletos de genes esenciales para una actividad particular.

Debido a estas razones, se han reportado el desarrollo de transposones como herramientas empleadas para la inserción aleatoria de promotores en ADN metagenómico y así aumentar la probabilidad en la expresión de genes. Transposones como MuExpress (Leggewie *et al.*, 2006), EZ-Tn5 <T7/KAN-2> buscan superar estas limitaciones; sin embargo, no existen reportes aparte de su desarrollo de que hayan sido realmente utilizadas en el contexto investigativo y por lo tanto, no existe evidencia del impacto que han tenido en los estudios de metagenómica funcional. Adicionalmente, la aplicación de estas herramientas ha estado limitada a hospederos que expresan la ARN polimerasa T7 a nivel genómico (ej. *E. coli* BI21 DE3). Esto ha restringido ampliamente el uso de estas herramientas genéticas en ensayos funcionales especialmente con ADN metagenómico, ya que la mayoría de los kits comerciales para la construcción de dichas librerías emplean cepas bacterianas diferentes (ej. *E. coli* EPI300). Por su parte, aunque se logró demostrar que el transposón TnC_T7 (Mongui *et al.*, 2016) favorece la expresión funcional de diferentes genes reporteros en el contexto de ADN metagenómico en una variedad de cepas de *E. coli*, el uso de este transposón se ha limitado a análisis funcionales solamente a esta especie bacteriana.

Por estos motivos, se considera que el desarrollo del transposón Mu_TnX, puede aportar a los estudios de metagenómica funcional al superar la restricción de hospederos que sinteticen la ARN polimerasa T7 al incluir en su secuencia una combinación de genes que permiten el funcionamiento de los promotores T7 bajo un sistema versátil e inducible, quedando comprobado su funcionamiento en la bacteria *P. putida* KT2440.

6. Conclusiones y Perspectivas

6.1 Conclusiones

Se presenta el diseño de Mu_TnX, una herramienta genética basada en el transposón TnC_T7 que, incluyendo la integración del sistema de expresión XylS-Pm mediante la estrategia de construcción con la plataforma SEVA, pretende hacer de esta una herramienta modificable y que se pueda rediseñar siguiendo las necesidades del investigador.

Combinando metodologías de síntesis química, clonación tradicional y PCR, se construyó el transposón Mu_TnX, que consiste en una secuencia de 6123 pb. Se logró obtener el transposón purificado y sus partes fueron verificadas mediante secuenciación.

La validación funcional del transposón Mu_TnX permitió comprobar su capacidad de transposición *in vitro* sobre plásmidos con alta eficiencia, al identificar un alto número de clones seleccionados por los marcadores de resistencia. De igual manera, mediante la inducción de la expresión del gen GFP en el plásmido pSEVA637, el cual no contenía previamente un promotor, se evidenció el funcionamiento de todo el sistema de expresión de Mu_TnX en cepas de *E. coli* y *P. putida*, constituyéndose así en la primera herramienta de este tipo que amplía su rango de hospederos.

En el contexto metagenómico evaluado, no se logró obtener una alta evidencia en cuanto a eventos de transposición y por lo tanto no fue posible determinar la capacidad de Mu_TnX para aumentar la expresión de genes que confieren

resistencia a arsénico. Sin embargo, se considera que el transposón cumple con las capacidades funcionales para ser evaluado en librerías metagenómicas.

6.2 Perspectivas


Para corroborar los resultados obtenidos y localizar el sitio de inserción de Mu_TnX, se está llevando a cabo secuenciación Sanger de clones positivos y negativos para expresión de GFP en el ensayo sobre el plásmido pSEVA637, así como los clones postransposición sobre el ADN fosmídico.

Para eventos futuros, se espera evaluar el funcionamiento de Mu_TnX sobre diferentes tipos de ADN episomal en la búsqueda de diferentes funciones, de manera que se pueda optimizar su funcionamiento. Por ejemplo, se podría aplicar la detección de fenotipos por métodos directos (como pigmentación de colonias, morfología de colonias irregular o formación de halo en recubrimientos de placas) y acoplarse a análisis de un mayor número de clones postransposición para recuperar los rasgos deseados.

Una vez establecidas las condiciones para su funcionamiento estándar sobre librerías metagenómicas, se espera que Mu_TnX pueda ser empleado como una herramienta para la búsqueda de genes, proteínas y compuestos novedosos empleando diferentes hospederos, como acción conjunta para superar las limitaciones actuales de la metagenómica funcional.

Anexos

Anexo 1: Secuencia Plantilla Mu_Pacl_AvrII sintetizada en Genscript



Make Research Easy
CONFIDENTIAL

U4176CD280-1(Mu_Pacl_AvrII)

```

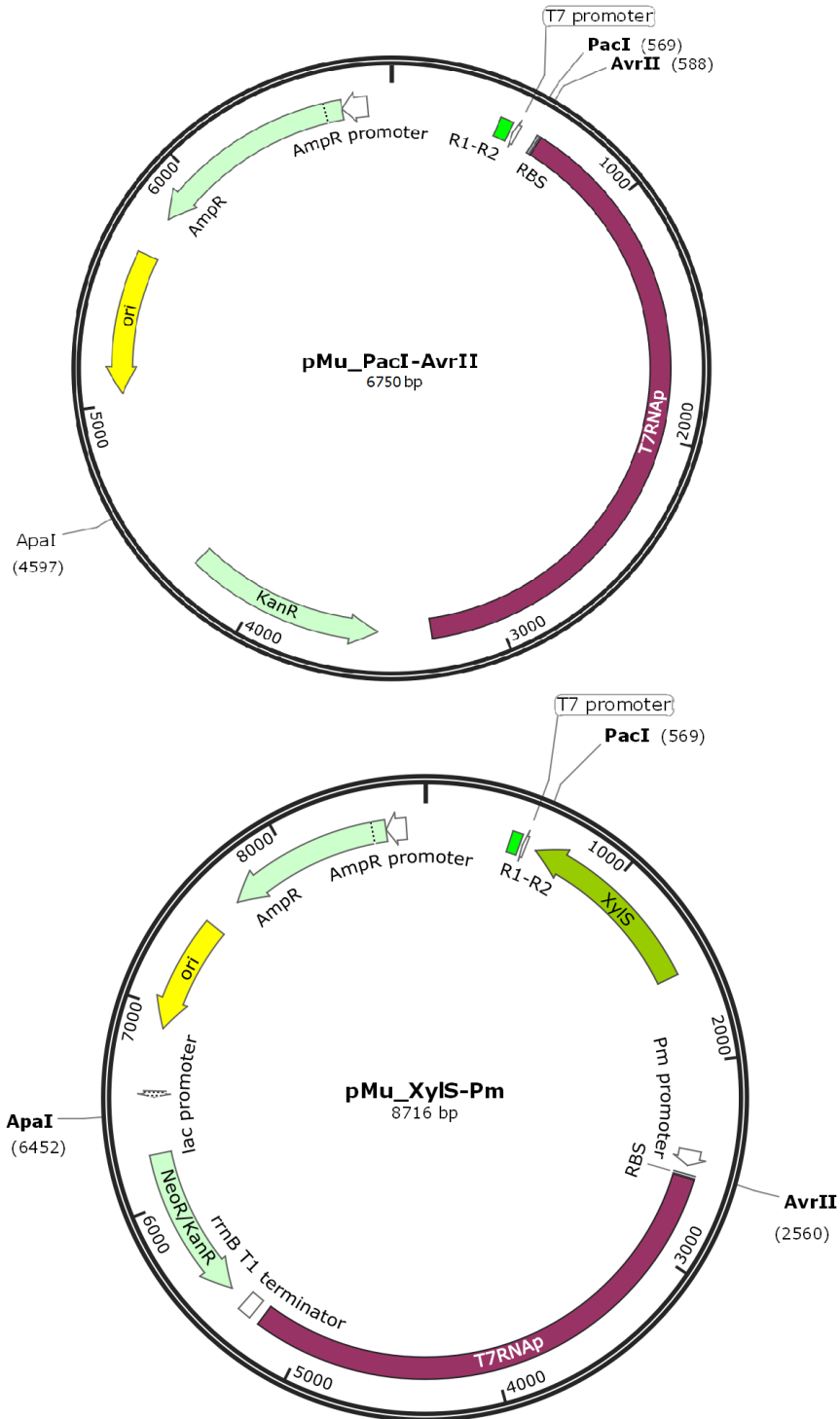
tcgcgcttccggtgatgacgggaaaacctctgacacatgcagctccgggagcgggtcacagcttctgtaagcggatgccgggagcagacaagccgctcagggcgcgtcagcgggtgtggcgggtctcggg
gctggcttaactatcgccatcagagcagattgctagtgagagtgccacatgctgggtgtaaatccgcacagatgcbtaaggagaaaaacgcgcatcagcgcgccattcggctcagcgtcgcaactgtggga
agggcgatcggtcgggctctctgctattacgccagctggcgaagggggatgtctcgaaggcgattaaagtggtaacgccagggtttcccagtcacagcgttgtaaaccgacggcagtgtaactgagctcg
gtacctcgcaatgcatctgataagctcgactcgcgaatgcatctgataaattcagggaagatctgaagcggcgacgaaaaacgcgaaagcgtttcagataaatcgaaaacggatcgtgtctccctatag
tgagctgtaataactggcgccctctcgggtgttctcgcatatttaaaaggctccagatccgcctaggaactagagaaagaggagaaatactagatgaacagattaacctcgaagcactctctga
catcgaactggctgctatcccgttaaacactctggctgaccattaaggctgagcgttttagctcgcgaacagttggcccttgagcatgagctctacgagatgggtgaaagcagcctccgcaagatgttgagcgtcaacta
aagctggtagggttgggataacgctccgccaaacctctcatcactccctacactccctcaagatgaltgcagcatcaacagcagtttgaggaaagtgaagcgaagcggcgaagcggcagacgctccagctt
ctgcaagaaatcaagccggaagccgtgacgtacatcaccattaagaccactctggctgctaacagctgctgacaatacaaccgttcaggctgtagcaagcgaatcggctggccaltgaggacgagctcgct
tcggctgtagccgtgacctgaagcactcaagaaaaacgttgaggacaactcaacaagcgttagggcacgtctacaagaaagcattatgcaagttgctgaggtgacatgctctcaaggctcactcg
gtggcagggcgtgcttctggcataaggaagactctattcatgtaggagctgctgcatcgagatgctcattgagcaccggaatggttagctacaccgcaaaatgctggcgtgtaggtcaagactctgaga
ctatcgaactgcactgaatacgtgaggctatcgcaacccgtcagggtcgtgctgctgcatctccgatgttccaaacttgctgtagtctcctaagccgtggactggcattaatgggtgtgctattgggctaac
ggctgctcctctggcgtgctgctacagtaagaaagcactgatgcctacgaagcgtttacatgctgaggtgtaaaaagcattaacattgcgcaaaacaccgcatggaaaatcaacaagaaagctct
agcggctccaacgtaatacacaagtggaagcattgtccggctcaggacatccctgcgaltgagcgtgaaagactccgatgaaaccggaagacatcgacatgaatcctgagcctcaccgctggaacgctg
ctgccgctgctgtgtaaccgaaagcgtcgaagctctgccgtatcagccttgagttcatgctgagcaagcacaatagtttgtaaccataagccactctggtccctcaaacatggactggcgcgtctgtt
tacgctgtgcaatgttcaaccgcaaggtaaagatgacccaaggaactgcttgcctggcgaaggtaaaccaatcggtaggaaggttaactctgctgaaatccacggctgcaaacctgtcgggtgtcgataa
ggttccgttccctgagcgcataagttcattgaggaaaaccagagaacatcatggctcgcctaagctcactggagaaacactgtggcgtgagcaagattctcgttctgctcttctgctttagtaccg
tgggttacagcaccagcctgagctataactgctccctccgctggcgttgacgggtcttgcctgacccagcacttctccgagctcctcgagatgaggtgaggtgctcggcggtaactgcttcttagtaaa
ccgttcaggacatcagggatgttgtaagaaagcaacagatctcaacagcagcgaatcaatggggaccgataacgaagtagtaccgtaccgatgagaacactgggtaaaactctgagaaaagcaagct
gggcaactaaggcactgctgcaatggcgtgcttaccgtgttaactcgcagtgtaagcgttcaatgacgtacgctgcttaacgggtccaagagttcgctcctcaacaagctgaggaagataccattcagcc
agctattgattccggcaaggtctgattcactcagccgaatcaggctcgtgatacgtgtaagctgattgggaactctgagcgtgacgggtgtagctgctggaagcaatgaaactgcttaagctctgct
aaactgctgctgtaggtcaagataagaagactggagagattcttccgaagcgttgcctgctgctgtaggttaactctgtagttccctgctgtagcaggaaatacaagaaagcctattcagacgcgcttgaacctg
atgttctcggctcagctcctacagcctaccataaaccacaacaaagatagcagattgatgcacacaaacaggagctggtatcctcctaactttgtaacagccaaagcggtagccaccttgaagactgtagt
gtgggcacaggaagbacggaatcgaatctttgactgattcagcactctcgtgtaacattccggctgacgtcgaactgttcaagcagtgccgcaaacatggttgacacatatgactgtgtagtactg
gctgatttctcagaccagttcgtgaccagttgacagctcaattggacaaaatccagcactccgctaaaggttaactgaaactccgtgacatcttagagtcggactcgcgttccgtaacgcaaatcaatac
gagaattctatgtaaccgggactcttagagtcgacaataaaacgaaaggctcagtcgaaagactggcctttctttatctgtttgtcggtagaacctctctactagagtcacactgctcactctcgggtggg
cctttctgctgtagggtggcgtcgtgctgctgctgattcgaacccagagctccgctcagaagaactcgtcaagaagcagataaaagcgtgctgcaatcgggagcgcgataaccgtaaacagcagag
gaaaggctcagcccattccgccaaactctcagcaatatacgggtgacaaagctatgctgtagcgtccgccacaccagccggcaccagtcgatgataccgaaagcggcctatttccacctgatat

```

860 Centennial Ave., Piscataway, NJ 08854, USA

Toll-Free: 1-877-436-7274 Tel: 1-732-885-9188 Fax: 1-732-210-0262 Email: order@genscript.com Web: www.genscript.com

Anexo 2: Diagramas teóricos de los plásmidos obtenidos en el proceso de construcción de Mu_TnX



Anexo 3: Alineamientos

Alineamiento de clon pMu_XylS-Pm contra secuencia teórica. C13 = Clon seleccionado para siguiente etapa de construcción. Se señala en recuadro rojo el mismatch correspondiente a la mutación dirigida para la eliminación del sitio *Bgl*II.

Teórica C13	TAAACGTTCTGTAATCAAGCCACTTCC-----CTTTTTGCATTGACGCAGGGTGTCCGGAAGGCAACTGCCGAACGCCTCTATAGTTTTACGGAAGCGTCCAAATGTAAGAAGCCGTAGTCTA -----CTTTTTGCATTGACGCAGGGTGTCCGGAAGGCAACTGCCGAACGCCTCTATAGTTTTACGGAAGCGTCCAAATGTAAGAAGCCGTAGTCTA
Teórica C13	GGGCATATCTCAGTTATACTACGCACATTGGCACTGGGATCGTTCAAGCAGGCAGGATGCTTTTCGAGCTTGGGTTGGGATGATGTTCTTCCGGCGTGGTCCGGCCTGCTTCTCGAACAA GGGCATATCTCAGTTATACTACGCACATTGGCACTGGGATCGTTCAAGCAGGCAGGATGCTTTTCGAGCTTGGGTTGGGATGATGTTCTTCCGGCGTGGTCCGGCCTGCTTCTCGAACAA
Teórica C13	AATTGTAGAGCGAGCGTGGACTATCATCGCCAGCTCCGCTAACCGCTCAAGGCTGATATTCGTTTGAGATTCTCCCAATGAATTGAACGACTCGCTCGAAAGCGGGTTACCTTTGCA AATTGTAGAGCGAGCGTGGACTATCATCGCCAGCTCCGCTAACCGCTCAAGGCTGATATTCGTTTGAGATTCTCCCAATGAATTGAACGACTCGCTCGAAAGCGGGTTACCTTTGCA
Teórica C13	TGAAAATTTACGGCTGACATTGCTGCCAGCATTTCGAGCAGCTTGAAGCGATGATCCCCGCATAGTGTCTTTGGACCCGAGGCATCGACTTTGTATGTTCCGCTTCGTCACAAAATA TGAAAATTTACGGCTGACATTGCTGCCAGCATTTCGAGCAGCTTGAAGCGATGATCCCCGCATAGTGTCTTTGGACCCGAGGCATCGACTTTGTATGTTCCGCTTCGTCACAAAATA
Teórica C13	ACCCGAGTAGATTGATAAAGCCATCGAGTTGCTGGAGATTGTGTCGCCGGCGAAACGGATACCCCTCCCTGGCTTGTGCCAATTGTTGTCACGTCACGCCGATCAAGGACACTGAGG ACCCGAGTAGATTGATAAAGCCATCGAGTTGCTGGAGATTGTGTCGCCGGCGAAACGGATACCCCTCCCTGGCTTGTGCCAATTGTTGTCACGTCACGCCGATCAAGGACACTGAGG
Teórica C13	GCAATTTAACGATAAATTTCTCGCAATCTTGAATAGGTAGGTCGGCTTGGTCTCCGGATTGAGCAGCAATAGTTCGCCGGCGCAAAAATAGTGTCTTGGCCATGGCCAGCCACCA GCAATTTAACGATAAATTTCTCGCAATCTTGAATAGGTAGGTCGGCTTGGTCTCCGGATTGAGCAGCAATAGTTCGCCGGCGCAAAAATAGTGTCTTGGCCATGGCCAGCCACCA
Teórica C13	GGCAATGGCCCTTTGAGTATTATTTGCAGATGATAACAGGCTCTAATCCAGGCGAGATTACCCCTACGCTACCGCCGTAGCTGATTCGACACAGATCGAGGCATCCGAAGATTCTGTGGT GGCAATGGCCCTTTGAGTATTATTTGCAGATGATAACAGGCTCTAATCCAGGCGAGATTACCCCTACGCTACCGCCGTAGCTGATTCGACACAGATCGAGGCATCCGAAGATTCTGTGGT
Teórica C13	GCAGCCTGCCTGCCGGCGCCGCCCTTGGGCGAGCGAATAGAGTGTACCGACATACCTGGTTAACATAATCGGAGACTGCATAGGGCTCGGCCGTGGACGAAGACTGACTTTTCTCGT GCAGCCTGCCTGCCGGCGCCGCCCTTGGGCGAGCGAATAGAGTGTACCGACATACCTGGTTAACATAATCGGAGACTGCATAGGGCTCGGCCGTGGACGAAGACTGACTTTTCTCGT
Teórica C13	TCAATAAGCAAAAATCCATAGTTACGGTTCCTTATTTTAAATGTGGCTGCTTGGTGTGATGTAGAAAAGGCCAAGTGCATGAAAATGCATCTCGACGTGATCGTATACGGGTTACC TCAATAAGCAAAAATCCATAGTTACGGTTCCTTATTTTAAATGTGGCTGCTTGGTGTGATGTAGAAAAGGCCAAGTGCATGAAAATGCATCTCGACGTGATCGTATACGGGTTACC
Teórica C13	CCCATGGCCAGTTGGCCATCCCTTTTTCGAATCAGTGACCCTTTTCCAAAGCAAAAATAACGCCAAGCAGAAGCAAGACGTTCTTTTAAAGAACGAGAACACCAGAAGTTCTGTGCTGT CCCATGGCCAGTTGGCCATCCCTTTTTCGAATCAGTGACCCTTTTCCAAAGCAAAAATAACGCCAAGCAGAAGCAAGACGTTCTTTTAAAGAACGAGAACACCAGAAGTTCTGTGCTGT
Teórica C13	CGGGCATGGGGCGACGAATTGGCGGATAAAGGGGATCGTGGATATTACGGCCCTTTTCTTGATGAATGCTCATCCGTAATTACGTATGGCAATGAAAGACGGTGAAGTGGTATG CGGGCATGGGGCGACGAATTGGCGGATAAAGGGGATCGTGGATATTACGGCCCTTTTCTTGATGAATGCTCATCCGTAATTACGTATGGCAATGAAAGACGGTGAAGTGGTATG
Teórica C13	GGATAGTGTTCACCCCTGTGTACCCGTTTTCATGAGCAAACTGAAAGCTTTTTCATCGCTCGGAGTGAATACACGACGATTTCGGCAGTTTCTACACATATATTCGCAAGATGTGGC GGATAGTGTTCACCCCTGTGTACCCGTTTTCATGAGCAAACTGAAAGCTTTTTCATCGCTCGGAGTGAATACACGACGATTTCGGCAGTTTCTACACATATATTCGCAAGATGTGGC
Teórica C13	GTGTTACGGTGAACCTGGCCATTTCCCTAAAGGGTTTATTGAGAATATGTTTTCTGCTCAGCCAACTCCCTGGGTGAGTTTACCAGTTTTGATTTAAACGTGGCCAAATATGGACAA GTGTTACGGTGAACCTGGCCATTTCCCTAAAGGGTTTATTGAGAATATGTTTTCTGCTCAGCCAACTCCCTGGGTGAGTTTACCAGTTTTGATTTAAACGTGGCCAAATATGGACAA
Teórica C13	CTTCTTCCGGCCGTTTTTACCATGCATGGGAATTAGCTTGTATCGACCAACGACGGTAGCGGAGCTATCCAAAGGGGATACAGGAAAACACACAGCAGGTACATCAGAACAGTAC CTTCTTCCGGCCGTTTTTACCATGCATGGGAATTAGCTTGTATCGACCAACGACGGTAGCGGAGCTATCCAAAGGGGATACAGGAAAACACACAGCAGGTACATCAGAACAGTAC
Teórica C13	CATGACTGAAGAACAAATAGTTTTTCTGATCCATAAAGCAGAAGGCCCTGCTCCATGACAACTGGCTCCCAACTAATGCCCATGCAAGCCAGCATAACAGCATAAAGTGCAGTG CATGACTGAAGAACAAATAGTTTTTCTGATCCATAAAGCAGAAGGCCCTGCTCCATGACAACTGGCTCCCAACTAATGCCCATGCAAGCCAGCATAACAGCATAAAGTGCAGTG
Teórica C13	TCCGGTTTGATAGGGATAAGTCCAGCCTTTCGAAGAAGCGGATACAGGAGTGC AAAAAATGGCTATCTCTAGTAAGGCCCTACCCCTTAGGCCTTTATGCAACAGAAAACAAATAATAGGAT TCCGGTTTGATAGGGATAAGTCCAGCCTTTCGAAGAAGCGGATACAGGAGTGC AAAAAATGGCTATCTCTAGTAAGGCCCTACCCCTTAGGCCTTTATGCAACAGAAAACAAATAATAGGAT

Anexo 4: Pasantías y Eventos

a. Certificado de pasantía internacional



Centro Nacional
de Biotecnología

Madrid, 4 de agosto de 2017

A QUIEN PUEDA INTERESAR,

Yo, Víctor de Lorenzo en calidad de Profesor de Investigación del Consejo superior de Investigaciones Científicas (CSIC) y como responsable del Departamento de Biología de Sistemas del Centro Nacional de Biotecnología (CNB- CSIC).

Certifico que, D. Adán Andrés Ramírez Rojas estuvo de estancia a tiempo completo como Asistente de Investigación en el Laboratorio de Microbiología Ambiental y Molecular del Centro Nacional de Biotecnología, para realizar su pasantía en el marco del proyecto "*Validación de una herramienta genética para favorecer la exploración de compuestos bioactivos derivados de la diversidad microbiana de Colombia*". Dicha estancia tuvo una duración de dos meses, desde el 1 de junio hasta el 2 de agosto de 2017.

A blue ink handwritten signature is written over a rectangular official stamp. The stamp contains the following text: "V. DE LORENZO (CSIC)", "CENTRO NACIONAL DE BIOTECNOLOGIA", "CAMPUS DE CANTOBLANCO", and "28049 MADRID (ESPAÑA)".

Atentamente,

Víctor de Lorenzo
Profesor de Investigación
Director del Programa de Biología de Sistemas
Centro Nacional de Biotecnología, CSIC
Campus de Cantoblanco, 28049 Madrid (España)
Móvil (+34) 609 062 062.
<http://www.cnb.csic.es/~meml>



b. Trabajo aceptado para presentación en modalidad póster en el evento V Bogotá Microbial Meeting – Julio 25 y 26 de 2019, Universidad Nacional de Colombia

Título: "Mu_TnX", una herramienta para favorecer la expresión de genes presentes en ADN episomal

Autores: Ramírez Rojas, Adán^{1,2}; Monguí, Álvaro³; Brandão, Pedro Filipe de Brito¹

¹Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá

²Corporación CorpoGen

³Universidad de Los Andes

Resumen

Introducción: Además de tener un importante papel en la naturaleza, los transposones son secuencias de ADN que también han mostrado ser herramientas ideales y ajustables a diferentes trabajos de investigación y desarrollo en biología molecular y biotecnología. Por ejemplo, pueden ser empleados como una alternativa que permite mejorar la expresión heteróloga de genes presentes en ADN episomal (ej. bibliotecas metagenómicas) que no son reconocidos por los hospederos bacterianos generalmente empleados. Debido a esto, se propuso el desarrollo de la herramienta denominada "Mu_TnX", un transposón de tipo Mu que puede ser empleado en estudios de análisis funcional de genes presentes en ADN episomal.

Materiales y métodos: Mediante herramientas computacionales, se realizó el diseño de la secuencia del transposón y se definió la estrategia para la construcción y ensamblaje de este. Utilizando metodologías de síntesis de ADN, PCR y clonación tradicional, se llevó a cabo la construcción del transposón, cuya integridad fue confirmada mediante secuenciación dirigida con primers diseñados para tal función. Se validó el funcionamiento de esta herramienta mediante la evaluación de su capacidad de transposición *in vitro* sobre un control de actividad empleando cepas de *Escherichia coli* y *Pseudomonas putida*.

Resultados: Se presenta el diseño final de la herramienta Mu_TnX, un transposón de 6123 pb. Su construcción fue completada mediante la combinación de diversas estrategias, pudiéndose obtener finalmente el transposón purificado para su uso. La capacidad de transposición *in vitro* fue comprobada al recuperar clones en las cepas evaluadas que exhiben resistencia a los antibióticos empleados como marcadores de selección.

Conclusión: Fue posible construir el transposón Mu_TnX de acuerdo con el diseño realizado. Se evidenció su capacidad de transposición *in vitro*. Actualmente, se está validando la capacidad de esta herramienta para favorecer la expresión de genes presentes en plásmidos, antes de cumplir el objetivo final de comprobar su actividad sobre bibliotecas metagenómicas.

Bibliografía

- Adu-Oppong, B., Gasparrini, A. J., & Dantas, G. (2017). Genomic and functional techniques to mine the microbiome for novel antimicrobials and antimicrobial resistance genes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1388(1), 42–58.
- Altermann, E., Kelly, W. J., Mora, D., Alvarez-Ordóñez, A., Coughlan, L. M., Cotter, P. D., & Hill, C. (2015). Biotechnological applications of functional metagenomics in the food and pharmaceutical industries. *Frontiers in Microbiology* | 1, 672.
- Bagdasarian, M., Lurz, R., Rückert, B., Franklin, F. C., Bagdasarian, M. M., Frey, J., & Timmis, K. N. (1981). Specific-purpose plasmid cloning vectors. II. Broad host range, high copy number, RSF1010-derived vectors, and a host-vector system for gene cloning in *Pseudomonas*. *Gene*, 16(1–3), 237–247.
- Bennett, P. M. (2009). Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *British Journal of Pharmacology*, 153(S1), S347–S357.
- Boolchandani, M., & Dantas, G. (2017). Functional Metagenomics to Study Antibiotic Resistance. In *Methods in Molecular Biology* (pp. 269–308).
- Brautaset, T., Lale, R., & Valla, S. (2009). Positively regulated bacterial expression systems Minireview. *Microbial Biotechnology*, 2(1), 15–30.
- Calderon, D., Peña, L., Suarez, A., Villamil, C., Ramirez-Rojas, A., Anzola, J. M., ... Mongui, A. (2019). Recovery and functional validation of hidden soil enzymes in metagenomic libraries. *MicrobiologyOpen*, 8(4), e00572.
- Cameron, A., Barbieri, R., Read, R., Church, D., Adator, E. H., Zaheer, R., & McAllister, T. A. (2019). Functional screening for triclosan resistance in a wastewater metagenome and isolates of *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp. from a large Canadian healthcare region. *PloS One*, 14(1), e0211144.
- Cao, Y., Fanning, S., Proos, S., Jordan, K., & Srikumar, S. (2017). A Review on the Applications of Next Generation Sequencing Technologies as Applied to Food-Related Microbiome Studies. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1829.
- Castillo Villamizar, G. A., Nacke, H., Boehning, M., Herz, K., & Daniel, R. (2019). Functional Metagenomics Reveals an Overlooked Diversity and Novel Features of Soil-Derived Bacterial Phosphatases and Phytases. *MBio*, 10(1).
- Chao, M. C., Abel, S., Davis, B. M., & Waldor, M. K. (2016). The design and analysis of transposon insertion sequencing experiments. *Nature Reviews. Microbiology*, 14(2), 119–128.
- Chavarría, M., Silva-rocha, R., Martí, E., Heras, A. De, Pa, A. D., Arce-rodri, A., ... Lorenzo, D. (2013). The Standard European Vector Architecture (SEVA): a coherent platform for the analysis and deployment of complex prokaryotic phenotypes, 41(November 2012), 666–675.
- Coughlan, L. M., Cotter, P. D., Hill, C., Alvarez-ordóñez, A., Kelly, W. J., & Mora, D. (2015). Biotechnological applications of functional metagenomics in the food and pharmaceutical industries, 6(June), 1–22.
- Craig, J. W., Chang, F. Y., Kim, J. H., Obiajulu, S. C., & Brady, S. F. (2010). Expanding

- small-molecule functional metagenomics through parallel screening of broad-host-range cosmid environmental DNA libraries in diverse proteobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(5), 1633–1641.
- Culligan, E. P., Sleator, R. D., Marchesi, J. R., & Hill, C. (2014). Metagenomics and novel gene discovery: promise and potential for novel therapeutics. *Virulence*, 5(3), 399–412.
- Dobrijevic, D., Di Liberto, G., Tanaka, K., de Wouters, T., Dervyn, R., Boudebouze, S., ... van de Guchte, M. (2013). High-Throughput System for the Presentation of Secreted and Surface-Exposed Proteins from Gram-Positive Bacteria in Functional Metagenomics Studies. *PLoS ONE*, 8(6).
- Dunivin, T. K., Yeh, S. Y., & Shade, A. (2019). A global survey of arsenic-related genes in soil microbiomes. *BMC Biology*, 17(1), 45. <https://doi.org/10.1186/s12915-019-0661-5>
- Ekkers, D. M., Cretoiu, M. S., Kielak, A. M., & Elsas, J. D. van. (2012). The great screen anomaly--a new frontier in product discovery through functional metagenomics. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93(3), 1005–1020.
- Ferrer, M., Beloqui, A., Timmis, K. N., & Golyshin, P. N. (2009). Metagenomics for Mining New Genetic Resources of Microbial Communities. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 16(1–2), 109–123.
- Feschotte, C., & Pritham, E. J. (2007). DNA Transposons and the Evolution of Eukaryotic Genomes. *Annual Review of Genetics*, 41(1), 331–368.
- Gabor, E., Liebeton, K., Niehaus, F., Eck, J., & Lorenz, P. (2007). Updating the metagenomics toolbox. *Biotechnology Journal*, 2(2), 201–206.
- Gabor, E. M., Alkema, W. B. L., & Janssen, D. B. (2004). Quantifying the accessibility of the metagenome by random expression cloning techniques. *Environmental Microbiology*, 6(9), 879–886.
- Gawin, A., Peebo, K., Hans, S., Ertesvåg, H., Irla, M., Neubauer, P., & Brautaset, T. (2019). Construction and characterization of broad-host-range reporter plasmid suitable for on-line analysis of bacterial host responses related to recombinant protein production. *Microbial Cell Factories*, 18(1), 80.
- Gawin, A., Valla, S., & Brautaset, T. (2017). Minireview The XylS / Pm regulator / promoter system and its use in fundamental studies of bacterial gene expression , recombinant protein production and metabolic engineering. *Microbial Biotechnology*, 00(0), 000–000.
- Godiska, R., Mead, D., Dhodda, V., Wu, C., Hochstein, R., Karsi, A., ... Ravin, N. (2010). Linear plasmid vector for cloning of repetitive or unstable sequences in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research*, 38(6), e88.
- Goldhaber-Gordon, I., Williams, T. L., & Baker, T. A. (2002). DNA recognition sites activate MuA transposase to perform transposition of non-Mu DNA. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(10), 7694–7702.
- Haapa-Paananen, S., Rita, H., & Savilahti, H. (2002). DNA transposition of bacteriophage Mu. A quantitative analysis of target site selection in vitro. *Journal of Biological Chemistry*, 277(4), 2843–2851.
- Haapa, S., Suomalainen, S., Eerikäinen, S., Airaksinen, M., Paulin, L., & Savilahti, H. (1999). An efficient DNA sequencing strategy based on the bacteriophage Mu *in vitro* DNA transposition reaction. *Genome Research*, 9(3), 308–315.
- Haapa, Saija, Taira, S., Heikkinen, E., & Savilahti, H. (1999). An efficient and accurate integration of mini-Mu transposons *in vitro*: A general methodology for functional genetic analysis and molecular biology applications. *Nucleic Acids Research*, 27(13), 2777–2784.

- Handelsman, J., Rondon, M. R., Brady, S. F., Clardy, J., & Goodman, R. M. (1998). Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chemistry & Biology*, 5(10), R245-9.
- Harshey, R. M. (2014). Transposable Phage Mu. *Microbiology Spectrum*, 2(5).
- Harshey, R. M., & Jayaram, M. (2006). The Mu Transpososome Through a Topological Lens. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 41(6), 387–405.
- Hickman, A. B., Chandler, M., & Dyda, F. (2010). Integrating prokaryotes and eukaryotes: DNA transposases in light of structure. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* (Vol. 45).
- Horton, R. M., Cai, Z., Ho, S. N., & Pease, L. R. (2013). Gene splicing by overlap extension: Tailor-made genes using the polymerase chain reaction. *BioTechniques*, 54(3), 528–535.
- Huo, Y.-Y., Jian, S.-L., Cheng, H., Rong, Z., Cui, H.-L., & Xu, X.-W. (2018). Two novel deep-sea sediment metagenome-derived esterases: residue 199 is the determinant of substrate specificity and preference. *Microbial Cell Factories*, 17(1), 16.
- Ivics, Z., Li, M. A., Mátés, L., Boeke, J. D., & Bradley, A. (2009). Transposon-mediated Genome Manipulations in Vertebrates. *Nature Methods*, 6(6), 415–422.
- Jung, Y., Kim, H., Hyeon, S., Rha, E., Choi, S., Yeom, S., ... Lee, S. (2016). Improved metagenome screening efficiency by random insertion of T7 promoters. *Journal of Biotechnology*, 230, 47–53.
- Kazazian, H. H. (2004). Mobile Elements: Drivers of Genome Evolution. *Science*, 303(5664), 1626–1632.
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., ... Drummond, A. (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 28(12), 1647–1649.
- Kipchirchir Bitok, J., Lemetre, C., Ternei, M. A., & Brady, S. F. (2017). Identification of biosynthetic gene clusters from metagenomic libraries using PPTase complementation in a *Streptomyces* host. *FEMS Microbiology Letters*, 364, 155.
- Knight, R., Jansson, J., Field, D., Fierer, N., Desai, N., Jed, A., ... Carolina, N. (2016). Unlocking the potential of metagenomics through replicated experimental design. *Nature Biotechnology*, 30(6), 513–520.
- Koga, A., Iida, A., Hori, H., Shimada, A., & Shima, A. (2006). Vertebrate DNA transposon as a natural mutator: The medaka fish Tol2 element contributes to genetic variation without recognizable traces. *Molecular Biology and Evolution*, 23(7), 1414–1419.
- Kudla, G., Murray, A. W., Tollervey, D., & Plotkin, J. B. (2009). Coding-sequence determinants of gene expression in *Escherichia coli*. *Science*, 324(5924), 255.
- Lämmle, K., Zipper, H., Breuer, M., Hauer, B., Buta, C., Brunner, H., & Rupp, S. (2007). Identification of novel enzymes with different hydrolytic activities by metagenome expression cloning. *Journal of Biotechnology*, 127(4), 575–592.
- Latorre Ochoa, S. M. (2014). *Búsqueda de genes de resistencia a arsénico en el metagenoma microbiano de la Sabana de Bogotá*. Recuperado de <http://www.bdigital.unal.edu.co/39517/>
- Lefevre, F., Robe, P., Jarrin, C., Ginolhac, A., Zago, C., Auriol, D., ... Nalin, R. (2008). Drugs from hidden bugs: their discovery via untapped resources. *Research in Microbiology*, 159(3), 153–161.
- Leggewie, C., Henning, H., Schmeisser, C., Streit, W. R., & Jaeger, K.-E. (2006). A novel transposon for functional expression of DNA libraries. *Journal of Biotechnology*, 123(3), 281–287.
- Li, R., Li, Z., Ma, K., Wang, G., Li, W., Liu, H.-W., ... Liu, X.-Z. (2019). Strategy for

- efficient cloning of biosynthetic gene clusters from fungi. *Science China Life Sciences*.
- Li, Y., Wexler, M., Richardson, D. J., Bond, P. L., & Johnston, A. W. B. (2005). Screening a wide host-range, waste-water metagenomic library in tryptophan auxotrophs of *Rhizobium leguminosarum* and of *Escherichia coli* reveals different classes of cloned *trp* genes. *Environmental Microbiology*, 7(12), 1927–1936.
- Lussier, F.-X., Chambenoit, O., Côté, A., Hupé, J.-F., Denis, F., Juteau, P., ... Shareck, F. (2011). Construction and functional screening of a metagenomic library using a T7 RNA polymerase-based expression cosmid vector. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 38(9), 1321–1328.
- Martínez-García, E., Aparicio, T., Goñi-Moreno, A., Fraile, S., & De Lorenzo, V. (2015). SEVA 2.0: An update of the Standard European Vector Architecture for de-/re-construction of bacterial functionalities. *Nucleic Acids Research*, 43(D1), D1183–D1189.
- Martínez-García, E., Aparicio, T., Lorenzo, V. De, & Nikel, P. I. (2014). New transposon tools tailored for metabolic engineering of Gram-negative microbial cell factories. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2, 1–13.
- Martínez-García, E., & Lorenzo, V. De. (2012). Transposon-Based and Plasmid-Based Genetic Tools for Editing Genomes of Gram-Negative Bacteria. In *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* (Vol. 813, pp. 267–283).
- McMahon, M. D., Guan, C., Handelsman, J., & Thomas, M. G. (2012). Metagenomic analysis of *Streptomyces lividans* reveals host-dependent functional expression. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(10), 3622–3629.
- Miskey, C., Izsvák, Z., Kawakami, K., & Ivics, Z. (2005). DNA transposons in vertebrate functional genomics. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62(6), 629–641.
- Mongui, A., del Portillo, P., Restrepo, S., & Junca, H. (2016). Nuevo transposón que promueve la expresión funcional de genes en ADNs episomales y un método para aumentar la transcripción de ADN en análisis funcionales de librerías. Colombia.
- Mullany, P. (2014). Functional metagenomics for the investigation of antibiotic resistance. *Virulence*, 5(3), 443–447.
- Nagayama, H., Sugawara, T., Endo, R., Ono, A., Kato, H., Ohtsubo, Y., ... Tsuda, M. (2015). Isolation of oxygenase genes for indigo-forming activity from an artificially polluted soil metagenome by functional screening using *Pseudomonas putida* strains as hosts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(10), 4453–4470.
- Nesmelova, I. V., & Hackett, P. B. (2010). DDE transposases: Structural similarity and diversity. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62(12), 1187–1195. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2010.06.006>
- Orsini, L., Pajunen, M., Hanski, I., & Savilahti, H. (2007). SNP discovery by mismatch-targeting of Mu transposition. *Nucleic Acids Research*, 35(6), 0–7.
- Pray, L. (2008). Transposons: The jumping genes. *Nature Education*, 1(1), 204. Recuperado de <http://www.nature.com/scitable/topicpage/transposons-the-jumping-genes-518>
- Price, M. A., Cruz, R., Baxter, S., Escalettes, F., & Rosser, S. J. (2019). CRISPR-Cas9 In Situ engineering of subtilisin E in *Bacillus subtilis*. *PLOS ONE*, 14(1), e0210121.
- Rice, P., & Kiyoshi, M. (1995). Structure of the bacteriophage Mu transposase core: A common structural motif for DNA transposition and retroviral integration. *Cell*, 82(2), 209–220.
- Rondon, M. R., August, P. R., Bettermann, A. D., Brady, S. F., Grossman, T. H., Liles, M. R., ... Handelsman, J. O. (2000). Cloning the Soil Metagenome: a Strategy for Accessing the Genetic and Functional Diversity of Uncultured Microorganisms

- Cloning the Soil Metagenome : a Strategy for Accessing the Genetic and Functional Diversity of Uncultured Microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(6), 2541–2547. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.6.2541-2547.2000>. Updated
- Sabree, Z. L., Rondon, M. R., & Handelsman, J. (2009). Metagenomics. *Genetics, Genomics*.
- Schloss, P. D., & Handelsman, J. (2003). Biotechnological prospects from metagenomics. *Current Opinion in Biotechnology*, 14(3), 303–310.
- Schwentner, A., Feith, A., Münch, E., Stiefelmaier, J., Lauer, I., Favilli, L., ... Blombach, B. (2019). Modular systems metabolic engineering enables balancing of relevant pathways for l-histidine production with *Corynebacterium glutamicum*. *Biotechnology for Biofuels*, 12, 65.
- Sharma, P., Kumari, H., Kumar, M., Verma, M., Kumari, K., Malhotra, S., ... Lal, R. (2008). From bacterial genomics to metagenomics: concept, tools and recent advances. *Indian Journal of Microbiology*, 48(2), 173–194.
- Shendure, J., & Ji, H. (2008). Next-generation DNA sequencing. *Nature Biotechnology*, 26(10), 1135–1145.
- Singh, B. K., & Macdonald, C. A. (2010). Drug discovery from uncultivable microorganisms. *Drug Discovery Today*, 15(17–18), 792–799.
- Sørensen, H. P., & Mortensen, K. K. (2005). Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, 115(2), 113–128.
- Sousa, R., & Mukherjee, S. (2003). T7 RNA polymerase. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, 73, 1–41.
- Tabor, S. (2001). Expression Using the T7 RNA Polymerase/Promoter System. In *Current Protocols in Molecular Biology* (Vol. Chapter 16, p. Unit16.2). Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.
- Taylor, R. G., Walker, D. C., & McInnes, R. R. (1993). *E.coli* host strains significantly affect the quality of small scale plasmid DNA preparations used for sequencing. *Nucleic Acids Research*, 21(7), 1677–1678.
- Uchiyama, T., & Miyazaki, K. (2009). Functional metagenomics for enzyme discovery: challenges to efficient screening. *Current Opinion in Biotechnology*, 20(6), 616–622.
- Vilen, H., Aalto, J., Kassinen, A., Paulin, L., & Savilahti, H. (2003). A Direct Transposon Insertion Tool for Modification and Functional Analysis of Viral Genomes. *Journal of Virology*, 77(1), 123–134.
- Warren, L., Freeman, J. D., Levesque, R. C., Smailus, D. E., Flibotte, S., & Holt, R. A. (2008). Transcription of foreign DNA in *Escherichia coli*. *Genome Research*, 18(604), 1798–1805.
- Watson, J., Gann, A., Baker, T., Levine, M., Bell, S., Losick, R., & Harrison, S. (2014). *Molecular Biology of the Gene*. Cold Spring Harbor Laboratory Press (7th Ed.).
- Welch, M., Govindarajan, S., Ness, J. E., Villalobos, A., Gurney, A., Minshull, J., & Gustafsson, C. (2009). Design parameters to control synthetic gene expression in *Escherichia coli*. *PLoS ONE*, 4(9).
- Wicker, T., Yu, Y., Haberer, G., Mayer, K. F. X., Marri, P. R., Rounsley, S., ... Roffler, S. (2016). DNA transposon activity is associated with increased mutation rates in genes of rice and other grasses. *Nature Communications*, 7, 12790.