



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN
ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA
CARRERA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA



Diseño y validación *in silico* de primers para la construcción de las variantes mutantes S121E, S121D, D186H y R280A de la enzima PETasa de *Ideonella sakaiensis* mediante tres diferentes métodos de mutagénesis dirigida al sitio

Trabajo de Titulación, modalidad Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniera Bioquímica, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Autor: Bryan Alexander Herrera Aldaz

Tutor: PhD. Cerda Mejía Liliana Alexandra

Ambato – Ecuador

MARZO 2022

APROBACIÓN DEL TUTOR

PhD. Liliana Alexandra Cerda Mejía

CERTIFICO:

Que el presente trabajo de titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este Trabajo de Titulación, Modalidad: Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Ambato, 01 de febrero del 2022

PhD. Liliana Alexandra Cerda Mejía

C.I. 180414808-6

TUTORA

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Bryan Alexander Herrera Aldaz, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Trabajo de Titulación bajo la modalidad Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniero Bioquímico, son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas bibliográficas.



Bryan Alexander Herrera Aldaz

C.I. 050287791-3

AUTOR

APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos profesores calificadores, aprueban el presente Trabajo de Titulación, modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firman:

Presidente del Tribunal

PhD. Irvin Ricardo Tubón Usca

CI: 0604250357

PhD. Santiago Casado Rojo

CI: 1759126954

Ambato, 03 de marzo de 2022

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este Trabajo de Titulación o parte de él, como documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación, según las normas de la Institución.

Cedo los Derechos en línea patrimoniales de mi Trabajo de Titulación, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.



Bryan Alexander Herrera Aldaz

C.I. 050287791-3

AUTOR

DEDICATORIA

A Dios

A mi madre Estelita Aldaz por su incondicional apoyo.

*A mis hermanos Héctor, Darwin, Josimar y Lady por
su apoyo motivacional.*

*A mi persona, por el coraje y esfuerzo para salir
siempre adelante.*

AGRADECIMIENTO

En esta etapa de la vida tan importante, pienso en aquellas personas que estuvieron conmigo en los buenos y malos momentos, les agradezco profundamente de corazón, son únicos y especiales.

En primer lugar, quiero agradecerle a Dios por brindarme las fuerzas, ánimos y el coraje en cada etapa de mi vida para poder culminar mis estudios.

A mi madre Estelita Aldaz, por orar todos los días por mí y siempre apoyarme en los momentos más difíciles que se ha presentado en este largo camino.

A mis hermanos Héctor, Darwin, Josimar y Lady por haberme apoyado y cuidado cada día mientras culminaba mis estudios.

A mi tutora Dra. Liliana Cerda y a mis profesores en especial al Dr. Mario García, por su enorme paciencia, tiempo y dedicación que supieron brindarme para culminar mi Proyecto de Investigación. Así mismo, les agradezco mucho por impartirme su sabiduría y conocimiento.

A mis amigos, Daniel, Christian y Judith por brindarme su amistad sincera y compañía, y por apoyarme siempre en mis locuras y aventuras.

A mis colegas y amigos de Labsag por abrirme las puertas en una de las etapas más cruciales de mi vida. Siempre les estaré agradecido y muchas gracias por todas las enseñanzas y compañía que me han brindado.

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DEL TUTOR	ii
DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD	iii
APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE GRADO	iv
DERECHOS DE AUTOR	v
DEDICATORIA	vi
AGRADECIMIENTO	vii
RESUMEN	xiii
ABSTRACT	xiv
CAPÍTULO I	1
MARCO TEÓRICO	1
1.1. Antecedentes de la Investigación.....	1
1.2. Polietileno Tereftalato.....	3
1.3. Degradación del PET	4
1.4. PETasa	5
1.5. Variantes mutantes S121E, S121D, D186H y R280A de <i>IsPETasa</i>	6
1.6. Métodos de mutagénesis dirigida al sitio.....	8
1.7. Variantes mutantes de la <i>IsPETasa</i> generadas por mutagénesis.....	11
1.8. Objetivos.....	14
1.8.1. Objetivo General	14
1.8.2. Objetivos Específicos.....	14
CAPÍTULO II	15
MATERIALES Y MÉTODOS	15
2.1. Materiales.....	15
2.1.1. Recursos Tecnológicos.....	15
2.2. Métodos	16
2.2.1. Identificación de métodos de mutagénesis dirigida al sitio	16

2.2.2.	Secuencia de <i>IsPETasa</i> y variantes mutantes.....	16
2.2.3.	Diseño <i>in silico</i> de primers para la construcción de las variantes mutantes S121E, S121D, D186H y R280A de la enzima <i>IsPETasa</i>	17
2.2.4.	Cálculo de la temperatura de Melting de cada conjunto de primers	17
2.2.5.	Validación <i>in silico</i> de los par de primers.....	18
2.2.6.	Validación del diseño de primers mediante PCR <i>in silico</i>	19
CAPÍTULO III		20
RESULTADOS Y DISCUSIÓN		20
3.1.	Análisis y discusión de datos	20
3.1.1.	Identificación de métodos de mutagénesis dirigida al sitio	20
3.1.2.	Obtención de la secuencia de <i>IsPETasa</i> y variantes mutantes.....	25
3.1.3.	Diseño <i>in silico</i> de primers para la construcción de las variantes mutantes S121E, S121D, D186H y R280A de la enzima <i>IsPETasa</i>	35
3.1.4.	Análisis del cálculo de la temperatura de Melting de cada par de primers.....	39
3.1.5.	Validación <i>in silico</i> de los pares de primers	40
3.1.6.	Validación del diseño de primers mediante PCR <i>in silico</i>	56
3.1.7.	Análisis del diseño de primers mediante los métodos de mutagénesis dirigida al sitio	58
CAPÍTULO IV		61
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES		61
4.1.	Conclusiones	61
4.2.	Recomendaciones.....	62
BIBLIOGRAFÍA		63
5.1.	Referencias bibliográficas	63
5.2	Anexos.....	71

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Datos de recopilación y determinación de estructuras de las variantes mutantes de <i>IsPETasa</i>	7
Tabla 2. Mutaciones de la secuencia de aminoácidos de la <i>IsPETasa</i>	12
Tabla 3. Recursos tecnológicos.	15
Tabla 4. Identificación de métodos de mutagénesis dirigida al sitio de <i>IsPETasa</i>	20
Tabla 5. Descripción general de los métodos de mutagénesis dirigida al sitio.	23
Tabla 6. Selección de codones para la generación de las variantes de <i>IsPETasa</i>	28
Tabla 7. Diseño de primers para la construcción de las variantes mutantes <i>IsPETasa</i> mediante los métodos de mutagénesis dirigida al sitio.	37
Tabla 8. Análisis de los parámetros de estabilidad termodinámica de los primers forward de las variantes mutantes <i>IsPETasa</i> mediante los métodos QuikChange®, Q5® Site-Directed Mutagenesis y Phusion Site-Directed Mutagenesis.	41
Tabla 9. Análisis de los parámetros de estabilidad termodinámica de los primers reverse de las variantes mutantes <i>IsPETasa</i> mediante los métodos de mutagénesis dirigida al sitio.	42
Tabla 10. Análisis de estructuras secundarias de los primers de los métodos de mutagénesis dirigida al sitio.	45
Tabla 11. Resultados de la PCR <i>in silico</i> de los par de primers de las variantes mutantes <i>IsPETasa</i> de los métodos de mutagénesis dirigida al sitio.	57

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Síntesis del PET por condensación de EG y TPA.....	3
Figura 2. Estructura general de la <i>IsPETasa</i> . Se presenta la estructura tridimensional, en donde se exponen la tríada catalítica (círculo de líneas rojas), láminas alfa (azul), láminas beta (rosa) y puentes disulfuro (etiquetas rojas).....	6
Figura 3. Actividad enzimática de <i>IsPETasa</i> silvestre (WT) y de variantes mutantes S121E, S121D y D186H.	8
Figura 4. Mutagénesis dirigida al sitio mediante PCR convencional.....	10
Figura 5. Secuencia de nucleótidos de <i>IsPETasa</i> presente en el plásmido pET21b(+)- <i>Is</i> -PETase sin cola de histidinas.	26
Figura 6. Traducción de la secuencia de nucleótidos de <i>IsPETasa</i> con ApE. Las mutaciones S121E, S121D, D186H y R280A se encuentran representadas en color.....	27
Figura 7. Alineamiento múltiple de las secuencias de nucleótidos de las variantes <i>IsPETasa</i> WT, S121E y S121D. Las mutaciones se encuentran representadas de color.....	31
Figura 8. Alineamiento múltiple de las secuencias de nucleótidos de las variantes <i>IsPETasa</i> WT y D186H. Las mutaciones se encuentran representadas de color.....	32
Figura 9. Alineamiento múltiple de las secuencias de nucleótidos de las variantes <i>IsPETasa</i> WT y D186H. Las mutaciones se encuentran representadas de color.....	33
Figura 10. Traducción de las secuencias de nucleótidos de las variantes mutantes S121E, S121D, D186H y R280A de <i>IsPETasa</i> . A. S121E; B. S121D; C. D186H; D. R280A.....	34
Figura 11. Alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de las variantes mutantes S121E, S121D, D186H y R280A de <i>IsPETasa</i> . Los cambios apropiados de los aminoácidos de cada variante mutante se representa en color.....	35
Figura 12. Alineamiento de las secuencias de los primers forward y reverse de las variantes mutantes S121E, D186H y R280A con la variante silvestre WT de <i>IsPETasa</i> del método QuikChange®. Las mutaciones de las variantes contenidas en los primers se representan en color.	47
Figura 13. Alineamiento de las secuencias de los primers forward y reverse de la variante mutante S121D con la variante silvestre WT de <i>IsPETasa</i> del método QuikChange®. La mutación de la variante contenida en el primer forward se representa en color.	49
Figura 14. Alineamiento de las secuencias de los primers forward y reverse de las variantes mutantes S121E, D186H y R280A con la variante silvestre WT de <i>IsPETasa</i> del método Q5® Site-Directed Mutagenesis. Las mutaciones de las variantes contenidas en los primers forward se representan en color.....	51
Figura 15. Alineamiento de las secuencias de los primers forward y reverse de las variantes mutantes S121D con la variante silvestre WT de <i>IsPETasa</i> del	

método Q5® Site-Directed Mutagenesis. La mutación de la variante contenida en el primer forward se representa en color.	52
Figura 16. Alineamiento de las secuencias de los primers forward y reverse de las variantes mutantes S121E, D186H y R280A con la variante silvestre WT de <i>IsPETasa</i> del método Phusion Site-Directed Mutagenesis. Las mutaciones de las variantes contenidas en los primers forward se representan en color.....	54
Figura 17. Alineamiento de las secuencias de los primers forward y reverse de la variante mutante S121D con la variante silvestre WT de <i>IsPETasa</i> del método Phusion Site-Directed Mutagenesis. La mutación de la variante contenida en el primer forward se representa en color.	56
Figura 18. Tabla de uso de codones en <i>E. coli</i>	71
Figura 19. Resultados de la PCR <i>in silico</i> de los primers de la variante mutante S121E de <i>IsPETasa</i> obtenidos por los métodos Q5® Site-Directed Mutagenesis y Phusion Site-Directed Mutagenesis: (A) Amplicón previsto N°01; (B) Amplicón previsto N°02. Los primers forward y reverse se encuentran representados en las partes superiores por flechas amarillas.	72
Figura 20. Resultados de la PCR <i>in silico</i> de los primers de la variante mutante S121D de <i>IsPETasa</i> obtenidos por los métodos Q5® Site-Directed Mutagenesis y Phusion Site-Directed Mutagenesis: (A) Amplicón previsto N°01; (B) Amplicón previsto N°02. Los primers forward y reverse se encuentran representados en las partes superiores por flechas amarillas.	72
Figura 21. Resultados de la PCR <i>in silico</i> de los primers de la variante mutante D186H de <i>IsPETasa</i> obtenidos por los métodos Q5® Site-Directed Mutagenesis y Phusion Site-Directed Mutagenesis: (A) Amplicón previsto N°01; (B) Amplicón previsto N°02. Los primers forward y reverse se encuentran representados en las partes superiores por flechas amarillas.	73
Figura 22. Resultados de la PCR <i>in silico</i> de los primers de la variante mutante R280A de <i>IsPETasa</i> obtenidos por los métodos Q5® Site-Directed Mutagenesis y Phusion Site-Directed Mutagenesis: (A) Amplicón previsto N°01; (B) Amplicón previsto N°02. Los primers forward y reverse se encuentran representados en las partes superiores por flechas amarillas.	73

RESUMEN

La enzima PETasa de *Ideonella sakaiensis* (*IsPETasa*) puede utilizarse para degradar el PET, sin embargo, aunque se ha informado hasta la fecha que posee la mayor actividad enzimática en condiciones normales de todas las enzimas degradantes de PET, su baja estabilidad térmica limita su análisis y aplicación. Por lo que, mediante mutagénesis dirigida se puede introducir mutaciones específicas en el ADN para incrementar significativamente su actividad enzimática. La finalidad de este estudio fue el diseño y validación *in silico* de primers para la construcción de las variantes mutantes S121E, S121D, D186H y R280A de *IsPETasa* mediante tres técnicas de mutagénesis dirigida al sitio: QuikChange, Q5 Site-Directed Mutagenesis y Phusion Site-Directed Mutagenesis.

Para el diseño de los primers, se consideró los parámetros contenidos en las directrices de diseño de los métodos de mutagénesis dirigida. Los resultados mostraron que los 24 primers obtenidos cumplen con los criterios generales como longitud, temperatura de melting, porcentaje de contenido de GC y la posición de la mutación en el primer. Para la validación de los primers propuestos, se realizó un análisis de horquillas, autodímeros y heterodímeros con herramientas bioinformáticas, los valores calculados se encuentran dentro de rangos aceptables.

Finalmente, la especificidad del diseño de los primers se llevó a cabo mediante alineamientos, cuyos resultados indican una alta especificidad para sus respectivos objetivos. Así mismo, mediante un ensayo *in silico* de PCR se confirmó la especificidad de los primers, los cuales representan el producto de amplificación esperado, demostrando de esta manera la correcta selección de los primers diseñados y la ejecución del proceso de PCR mutagénica.

Palabras claves: Bioinformática, diseño de primers, gestión de residuos, mutagénesis dirigida, PETasa, *Ideonella sakaiensis*.

ABSTRACT

The PETase enzyme from *Ideonella sakaiensis* (IsPETase) can be used to degrade PET, however, although it has been reported to date to have the highest enzymatic activity under normal conditions of all PET degrading enzymes, its low thermal stability limits its analysis and application. Therefore, by targeted mutagenesis, specific mutations can be introduced into the DNA to significantly increase its enzymatic activity. The purpose of this study was the design and *in silico* validation of primers for the construction of S121E, S121D, D186H and R280A mutant variants of IsPETase using three site-directed mutagenesis techniques: QuikChange, Q5 Site-Directed Mutagenesis and Phusion Site-Directed Mutagenesis.

For the design of the primers, the parameters contained in the design guidelines for targeted mutagenesis methods were considered. The results showed that the 24 primers obtained meet the general criteria such as length, melting temperature, percentage of GC content and the position of the mutation in the primer. For the validation of the proposed primers, hairpin, autodimer and heterodimer analysis was performed with bioinformatics tools, the calculated values are within acceptable ranges.

Finally, the specificity of the primers design was carried out by means of alignments, whose results indicate a high specificity for their respective targets. Likewise, an *in silico* PCR assay confirmed the specificity of the primers, which represent the expected amplification product, thus demonstrating the correct selection of the designed primers and the execution of the mutagenic PCR process.

Keywords: Bioinformatics, primer design, residue management, targeted mutagenesis, PETase, *Ideonella sakaiensis*.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes de la Investigación

El polietileno tereftalato $(C_{10}H_8O_4)_n$, o más conocido como PET, es el polímero sintético más utilizado a nivel industrial. Debido a sus propiedades físico-químicas y mecánicas, el PET es particularmente útil en la industria alimentaria como material de empaque y envasado. Sin embargo, debido a su alta estabilidad y resistencia a la degradación biológica, la mala gestión de residuos y los inconvenientes para su reciclaje, el PET se ha convertido en un problema alarmante tanto para el ambiente como para la salud humana (**Kawai et al., 2019**).

Los principales problemas ambientales resultantes de la producción de PET y el bajo nivel de eficacia de las técnicas para su tratamiento (químico y físico) han motivado el estudio de nuevos procedimientos para degradar este polímero. Recientemente, la bacteria *Ideonella sakaiensis* fue aislada a partir de los sedimentos procedentes de una planta de reciclaje de plástico (**Seo et al., 2019**).

La bacteria posee la capacidad de metabolizar el PET como su principal fuente de carbono y energía. Para ello, *I. sakaiensis* produce las enzimas PETasa y MHETasa, las cuales son capaces de hidrolizar el PET y MHET (ácido mono 2-hidroxietil tereftálico), respectivamente, en etilenglicol (EG) y ácido tereftálico (TPA) (**Palm et al., 2019**). De esta forma, ambas enzimas son altamente atractivas para el desarrollo de nuevas tecnologías que permitan reciclar el PET eficientemente.

De acuerdo con un análisis minucioso de la literatura, varios estudios han reportado la generación y caracterización de variantes mutantes de la enzima PETasa de *I. sakaiensis* (*IsPETasa*), los cuales han permitido elucidar el mecanismo de reacción de la enzima e identificar mutaciones puntuales que favorecen tanto su actividad enzimática como su estabilidad térmica (**Moog et al., 2019**). Se ha identificado que las variantes mutantes S121E, S121D, D186H y R280A de *IsPETasa* exhiben una mayor actividad enzimática y una mejor actividad de degradación incluso

empleando PET con alta cristalinidad como el que se encuentra en botellas y películas que se emplean en empaques de alimentos (**Son et al., 2019**).

En un estudio pionero realizado por **Furukawa et al., (2018)**, diseñaron cuatro mutantes R34E, R53E, R90E y K95E para la construcción del plásmido pET21b(+)-*Is*-PETasa mediante mutagénesis dirigida al sitio que les permitió aumentar la aceleración del proceso de degradación enzimática del PET a través del recubrimiento superficial con tensioactivos aniónicos. En esta investigación se demostró que la pre-incubación del polímero de PET con tensioactivos aniónicos aumentaba la actividad de la PETasa catiónica, dando como resultado una hidrólisis eficiente.

Joo et al., (2018), desarrollaron dos variantes mutantes Y87A y W185A mediante mutagénesis dirigida al sitio que hace que la *Is*PETasa tenga la capacidad de degradar el BHET. Los resultados obtenidos por estos autores presentaron que las mutaciones realizadas permitieron una mejora en la actividad enzimática del 5% frente al BHET en comparación con la variante silvestre (WT).

C. Liu et al., (2019), diseñaron tres variantes mutantes S93M, W159F y N241F mediante mutagénesis dirigida al sitio con el fin de que la *Is*PETasa posea la capacidad de hidrolizar ésteres de naftilo. La ingeniería y estructura α/β -hidrolasa de esta enzima puede representar un avance que permita utilizarla para el diseño de enzimas que puedan hidrolizar una variedad de poliésteres.

De la misma manera, en varios estudios se ha identificado que la metodología para la obtención de las diferentes variantes mutantes de *Is*PETasa es heterogénea, ya que para este fin se han empleado distintas estrategias y kits comerciales de mutagénesis dirigida al sitio. La mayoría de variantes mutantes de *Is*PETasa fueron obtenidas empleando los kits QuikChange® (**Agilent Technologies, 2021**), Q5® Site-Directed Mutagenesis (**New England Biolabs, 2021**) o Phusion Site-Directed Mutagenesis (**ThermoScientific, 2021**).

La aplicación de cada kit comercial está limitada a las disponibilidades económicas y técnicas de cada grupo de investigación, y debe atravesar procesos de

estandarización. Por lo tanto, es indispensable analizar las potenciales dificultades para la aplicación de cada método, principalmente, el diseño de primers, ya que es uno de los aspectos más importantes en el diseño de una PCR mutagénica (Zhu, 1996).

1.2. Polietileno Tereftalato

El PET es un poliéster o polímero sintético compuesto de monómeros de tereftalato de etileno, junto con un éster de ácido tereftálico con etilenglicol. Este polímero termoplástico se obtiene mediante condensación del EG y TPA, unidos por enlaces éster (Figura 1), y por esterificación de EG y tereftalato de dimetilo (DMT). Gracias a sus propiedades físicas como su fuerte naturaleza hidrofóbica y la inercia del enlace éster, hacen que el PET se caracterice por su capacidad reversible de deformarse o derretirse a temperaturas altas y de endurecerse a temperaturas menores (Widyastuti, 2018).

El PET a nivel comercial es un compuesto semi-cristalino constituido por una fracción cristalina y otra amorfa que varía de proporción según el producto fabricado. Debido a sus propiedades físicas, facilidad de fabricación, durabilidad y bajo precio, el PET representa uno de los plásticos más producidos y utilizados en las industrias como componente de empaques de bebidas y alimentos, y como compuesto sintético en vestimentas. Sin embargo, su acumulación en el medio ambiente en forma de envases y textiles es de gran escala y a un nivel alarmante (García & Sánchez, 2016).

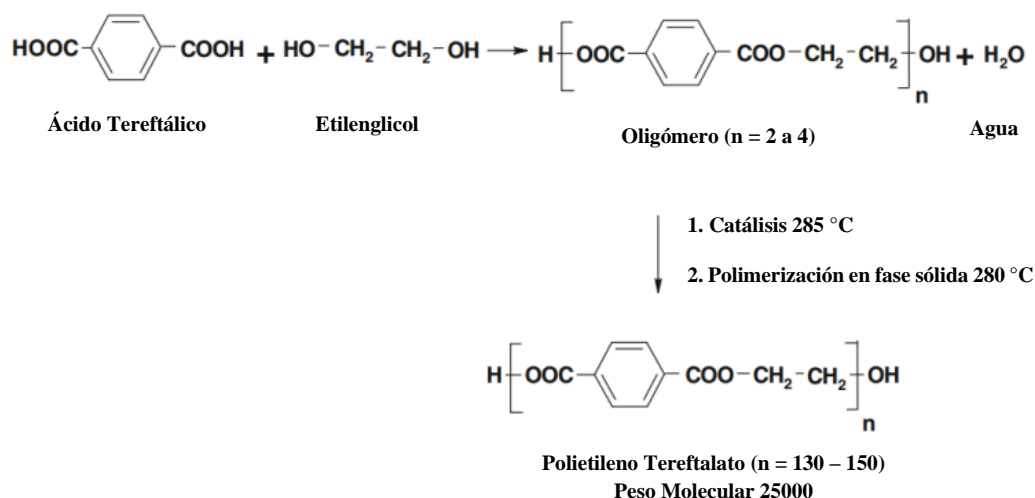


Figura 1. Síntesis del PET por condensación de EG y TPA.

Fuente: Modificado de Pérez, (2020).

1.3. Degradación del PET

El PET se encuentra constituido por moléculas pequeñas entrelazadas mediante enlaces éster. Por lo general, para la eliminación o degradación del PET se utilizan técnicas como la incineración, pirólisis o sustancias químicas. Dichos métodos no solo necesitan de elevadas temperaturas y presiones, sino que también dan lugar a la producción de compuestos finales como metales pesados, bifenilos policlorados (PCB) e hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) que pueden ser tóxicos y peligrosos para el medio ambiente (**Arvanitoyannis et al., 2001**).

Los microorganismos que contienen enzimas hidrolíticas tienen la capacidad de romper estos enlaces generando monómeros para su nutrición. Sin embargo, la degradación del PET se encuentra influenciada por sus propiedades fisicoquímicas y por su susceptibilidad (**Holland & Hay, 2002**). La velocidad de degradación del PET es afectada por el movimiento de las cadenas del polímero, que se encuentra determinada por la diferencia de las temperaturas de fusión y degradación; y por un alto nivel de cristalinidad. La baja biodegradabilidad y resistencia que posee el PET se debe a que en su estructura contiene unidades aromáticas de tereftalato que impiden el movimiento de las cadenas del polímero. Así mismo, su superficie hidrofóbica actúa como una barrera importante para la biodegradación que limita la acción de enzimas hidrolíticas y el crecimiento microbiano (**Hiraga et al., 2019**).

Existen bacterias relevantes que poseen la capacidad de degradar el PET. Dentro de ellas, se encuentran aquellas que pertenecen al género de las *Pseudomonas* e *I. sakainensis*, la cual tienen la característica de secretar enzimas que degradan el PET, por medio de la catálisis de los enlaces éster mediante una reacción de hidrólisis. Las principales enzimas corresponden a las hidrolasas como esterasas, lipasas, cutinasas y carboxilesterasas (**Pirzadeh et al., 2007**). De acuerdo con el estudio de **Yoshida et al., (2016)**, se demostró que la capacidad notable y esencial para la hidrólisis del PET que posee *I. sakainensis* se debe por la acción de dos enzimas con actividad hidrolítica, la PETasa y la MHETasa. La primera hidroliza el PET en MHET para luego ser transportado al espacio periplásmico (membrana exterior) de la bacteria y finalmente ser hidrolizado por la acción de la MHETasa.

1.4. PETasa

Es una enzima también denominada PET hidrolasa, cuya secreción y síntesis se da de manera natural por la bacteria *I. sakainensis*. La PETasa es una esterasa que cataliza el enlace éster, lo cual facilita la degradación del PET en compuestos mayoritarios de MHET, ácido tereftálico mono (2-hidroxiethyl) (BHET) y TPA en menores cantidades. Así mismo, la PETasa también posee la capacidad de degradar uno de los intermediarios de la reacción, el BHET transformándolo en MHET mediante hidrólisis (**Knott et al., 2020**). Sin embargo, la PETasa muestra dos características que dificultan su purificación y uso. La primera es su baja estabilidad, que provoca su desnaturalización con facilidad en entornos oxidantes y la desestabilización de la estructura debido a la formación de puentes disulfuros. En segundo lugar, se debe considerar los bajos grados de secreción y expresión de la enzima de manera natural, lo que imposibilita la obtención de altas concentraciones de la misma (**Acosta, 1999**).

Gracias al análisis filogenético, se ha identificado que la *IsPETasa* se encuentra dentro de la familia de las cutinasas y presenta una gran similitud con otros miembros de la familia pertenecientes a *Thermobifida* como TfCut2, TaCut y SvCut. La *IsPETasa* contiene un marco de lectura abierto (ORF) que codifica una lipasa, un sitio activo que posee un pliegue α - β -hidrolasa constituido por una lámina beta de 9 fibras flanqueada por 6 hélices alfa y denominado como “dominio de la tapa” (Figura 2). Por esta razón, a pesar del alto nivel de similitud entre la estructura cristalina de varias cutinasas con la PETasa, su eficiencia catalítica es varias veces superior, ya que esta enzima tiene una alta especificidad por el PET y BHET en comparación con otras enzimas hidrolíticas (**Han et al., 2017**).

Es importante mencionar que; hasta la actualidad la *IsPETasa* posee un gran rendimiento en la hidrólisis del PET, por tal motivo, no solo presenta una mayor actividad de degradación que cualquier otra enzima estudiada, sino que también trabaja a temperatura moderada (30 °C), lo que demuestra su aplicabilidad en el medio ambiente y en otras áreas de estudio (**C.-C. Chen et al., 2018**).

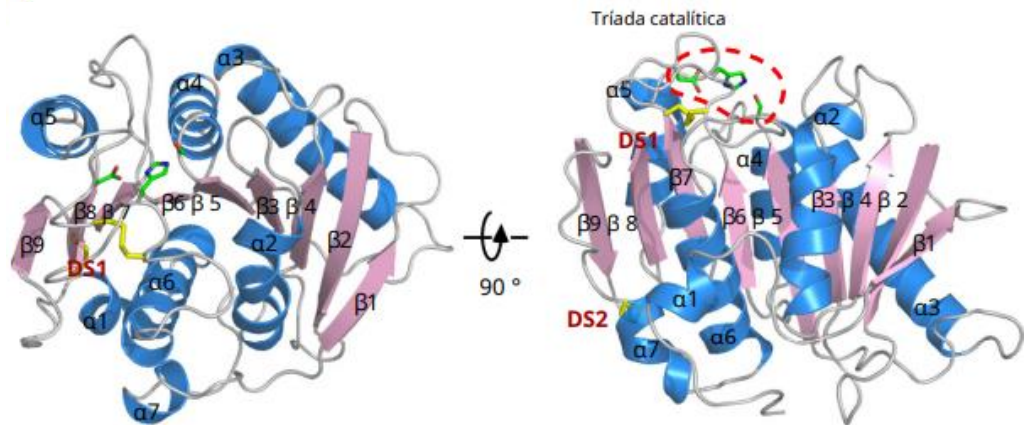


Figura 2. Estructura general de la *IsPETasa*. Se presenta la estructura tridimensional, en donde se exponen la tríada catalítica (círculo de líneas rojas), láminas alfa (azul), láminas beta (rosa) y puentes disulfuro (etiquetas rojas).

Fuente: Tomado de Han et al., (2017).

1.5. Variantes mutantes S121E, S121D, D186H y R280A de *IsPETasa*

En la actualidad, aunque existen estudios que mencionan que la *IsPETasa* posee la actividad de degradación de PET más alta en condiciones normales en comparación a otras enzimas, la baja estabilidad térmica limita la eficiencia y el proceso de degradación completa del PET. Gracias a la información estructural de la *IsPETasa* y al desarrollo de métodos de mutagénesis dirigida, se han generado diferentes variantes mutantes con una mayor actividad enzimática y estabilidad térmica que permite el mejoramiento de la actividad degradativa del PET (Maity et al., 2021).

Algunos de los resultados alcanzados durante las modificaciones estructurales para las variantes mutantes S121E, D186H y R280A de *IsPETasa* se muestran en la Tabla 1 (Son et al., 2019).

Tabla 1. Datos de recopilación y determinación de estructuras de las variantes mutantes de *IsPETasa*.

	<i>IsPETasa S121D</i>	<i>IsPETasa S121E, D186H y R280A</i>
<i>Longitud de onda (Å)</i>	0.979	0.979
<i>Contenido de disolvente (%)</i>	47.20	54.84
<i>Carcasa de alta resolución (Å)</i>	1.42 – 1.40	1.98 – 1.95
<i>Rango de resolución (Å)</i>	50.0 – 1.40	50.0 – 1.95
<i>Redundancia</i>	3.2 (2.9)	3.5 (3.1)
<i>Reflejos únicos</i>	46596	19893
<i>Integridad (%)</i>	99.0 (98.5)	97.4 (94.2)
<i>Refinamiento (%)</i>	19.4	15.1
<i>Número de moléculas de agua</i>	225	188
<i>Número de residuos de aminoácidos</i>	261	261

Fuente: Modificado de Son et al., (2019).

En la Figura 3, se representa la actividad enzimática de *IsPETasa* de las variantes mutantes mencionadas (Son et al., 2019). De manera general, las variantes mutantes S121E, S121D, D186H y R280A presentan una mayor actividad enzimática sobre PET de alta cristalinidad como el que se encuentra en botellas y películas. Así mismo, se obtiene mayor termoestabilidad y actividad de degradación con las mutaciones mencionadas, ya que; de acuerdo con el análisis de estos autores, se puede evidenciar un incremento de la actividad enzimática de las variantes mutantes S121E, S121D, D186H y R280A de hasta 14 veces superior a 40 °C/72 h en comparación con las variantes silvestre (WT) y mutante P181A (Figura 3). Por lo que, la estrategia planteada y las variantes mutantes desarrolladas en este estudio, puede representar un progreso fundamental que permita alcanzar la biodegradación completa del PET en condiciones normales o suaves.

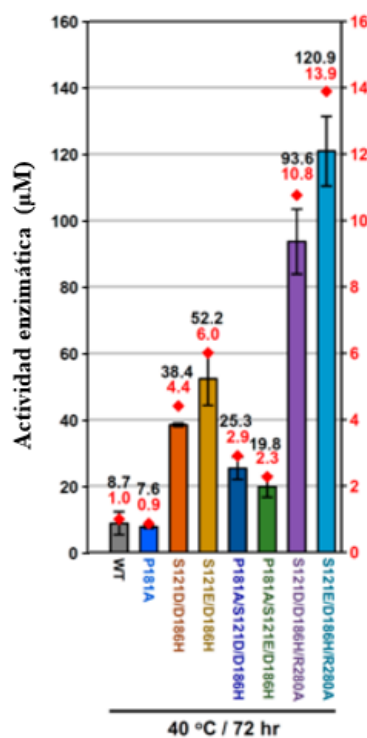


Figura 3. Actividad enzimática de *IsPETasa* silvestre (WT) y de variantes mutantes S121E, S121D, D186H y R280A.

Fuente: Modificado de Son et al., (2019).

1.6. Métodos de mutagénesis dirigida al sitio

La mutagénesis dirigida al sitio (MDS) se denominó inicialmente como mutagénesis dirigida por oligonucleótidos y se desarrolló principalmente en ADN monocatenario de fagos Φ X174 de *E. coli*. Las secuencias nucleotídicas eran complementarias a la plantilla base a excepción de una base nucleotídica seleccionada para introducir una mutación sin sentido. La MDS es un método inventado por Michael Smith en la década de 1970 empleado para mutar y alterar secuencias específicas de ADN en el laboratorio. Posteriormente, a finales de 1980, se introdujo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), otro método de laboratorio, en el proceso de la MDS (Hemsley et al., 1989).

El procedimiento de la MDS emplea fragmentos cortos de ADN sintético monocatenario u oligonucleótidos (primers o cebadores), con mutaciones específicas

en un plásmido de ADN bicatenario para operar como moldes en presencia de ADN polimerasa (**Edelheit et al., 2009**). Aunque la MDS es un método *in vitro* que permite el desarrollo de una mutación específica en una secuencia conocida, generalmente se lleva a cabo utilizando técnicas basadas en procedimientos de PCR (mutagénesis), en donde la disponibilidad de secuencias o fragmentos de ADN bicatenario-sintéticos (dsDNA) son diseñados con el objetivo de disminuir el tiempo y los procesos necesarios para conseguir cambios de secuencia similares (**Bachman, 2013**).

La importancia de la MDS radica más allá de la relación entre la función y estructura de los genes, ya que este método permite la generación de proteínas o enzimas mutantes que disponen de nuevas características interesantes. Dichos mutantes pueden contener solamente cambios menores de una sola base o nucleótido (técnica del cebador único), pero no es raro eliminar o agregar secciones completas (**B. Z. Zhang et al., 2009**).

Los métodos de MDS se pueden dividir en dos amplias categorías en función de si están basados o no en la PCR, siendo los primeros los que se emplea con mayor frecuencia. Cuando se emplea PCR con MDS, los primers son diseñados para insertar la alteración o mutación de interés (cambios de base) mediante la incorporación del amplicón que sustituye la secuencia original. Estas mutaciones pueden ser incluidas, ya sea por adición, sustitución o eliminación de bases, pero solo pueden introducirse en secciones de la secuencia complementaria a los primers y no en zonas entre los mismos (Figura 4) (**Sabel, 2012**).

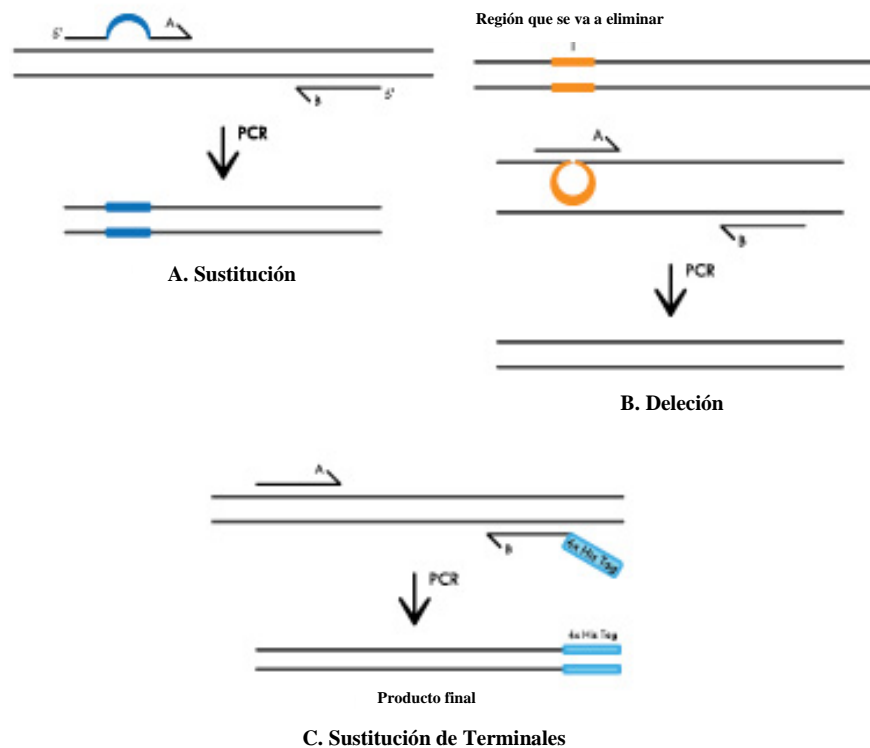


Figura 4. Mutagénesis dirigida al sitio mediante PCR convencional.

Fuente: Modificado de Sabel, (2012).

La MDS es esencial en la biología molecular, ingeniería genética y bioquímica moderna, ya que también se ha empleado en estudios mecánicos y funcionales de enzimas y proteínas, para hacer que estas sean más adaptables en procesos bioquímicos y biofísicos. Estos incluyen la incorporación de nuevas actividades enzimáticas catalíticas, la creación de secuencias de proteínas más adecuadas para caracterización y la inmunización de anticuerpos, siendo el QuikChange® uno de los kits comerciales con MDS más utilizado y que ha sido desarrollado por Stratagene (K. Zhang et al., 2021).

Actualmente, se han descrito varios métodos de MDS, la gran mayoría se encuentra disponibles en kits comerciales basados en mutagénesis. Estos procedimientos necesitan de cepas únicas de *E. coli* o de una alteración específica como el kit desarrollado por Thermo “Phusion Site-Directed Mutagenesis”. Las técnicas más empleadas por lo general no exigen de modificaciones o de cepas únicas, ya que incluyen alteraciones o mutaciones puntuales en el plásmido con primers estándar mediante PCR inversa. El diseño de los primers para estas técnicas, se pueden

llevar a cabo ya sea por orientación espalda – espalda (Q5® Site-Directed Mutagenesis) o por una superposición como el QuikChange® (Li et al., 2015). En la presente investigación también se identificará varios métodos de mutagénesis dirigida al sitio que permita la construcción de las variantes mutantes S121E, S121D, D186H y R280A de la *IsPETasa*.

1.7. Variantes mutantes de la *IsPETasa* generadas por mutagénesis

Con el fin de mejorar la actividad enzimática y la termoestabilidad de la *IsPETasa* se han generado diferentes mutantes. En la Tabla 2, se detallan las mutaciones realizadas en la cadena de aminoácidos de la enzima y los resultados obtenidos hasta la actualidad (UniProt, 2021).

Una de las primeras variaciones establecidas para comprender el mecanismo de degradación del PET, fue el cambio de uno de los aminoácidos correspondientes a la triada catalítica con las mutaciones S160A, D206A, H237A reduciendo severamente la actividad enzimática (Joo et al., 2018). Otra de las mutaciones principales fue la modificación C174A/C210A con la finalidad de otorgar a la PETasa la capacidad de desaparecer el puente disulfuro para generar una baja o nula actividad (Sánchez, 2021).

Por otra parte, Son et al., (2019) mediante el uso de la ingeniería racional de proteínas por la información estructural de la *IsPETasa* y mutagénesis dirigida, mejoran la estabilidad térmica y la actividad de degradación del PET hasta 14 veces a 40 °C en relación con la PETasa silvestre. En este estudio, las mutaciones realizadas correspondieron a las variantes S121E/D186H/R280A permitiendo mayor actividad enzimática frente al PET.

Tabla 2. Mutaciones de la secuencia de aminoácidos de la IsPETasa.

<i>Posición de la mutación</i>	<i>Variante o mutación</i>	<i>Descripción de la actividad</i>
87	Y → A	- Mayor actividad enzimática en botellas de PET. - Menor actividad enzimática en películas de PET y BHET.
93	S → M	- Mayor actividad enzimática por el butirato de 1-naftilo.
119	Q → R	- Menor actividad enzimática en botellas de PET y BHET.
121	S → E	- Mayor capacidad de degradación del PET y termoestabilidad (14 veces a 40°C) al relacionar con H-186 y A-280.
159	W → A	- Menor actividad enzimática en películas de PET y BHET.
159	W → F	- Mayor actividad enzimática por el butirato de 1-naftilo.
159	W → H	- Mayor actividad enzimática en botellas de PET y BHET. - Mayor capacidad de degradación del PET y PEF al relacionar con F-238.
160	S → A	- Menor actividad enzimática en botellas de PET y BHET.
161	M → A	- Menor actividad enzimática en botellas de PET y BHET.
185	W → A	- Menor capacidad de degradación del PET. - Menor actividad enzimática en BHET.
186	D → H	- Mayor capacidad de degradación del PET y termoestabilidad (14 veces a 40°C) al relacionar con E-121 y A-280.

203	C → A	- Menor actividad enzimática en películas de PET y BHET al relacionar con A-239.
206	D → A	- Menor actividad enzimática en botellas de PET y BHET.
214	S → H	- Mayor actividad enzimática en botellas de PET.
237	H → A	- Menor actividad enzimática en botellas de PET y BHET.
238	S → F	- Menor actividad enzimática en películas de PET y BHET. - Mayor capacidad de degradación del PET y PEF al relacionar con H-159.
239	C → A	- Menor actividad enzimática en películas de PET y BHET al relacionar con A-203.
241	N → A	- Menor actividad enzimática en películas de PET y BHET
241	N → F	- Mayor actividad enzimática por el butirato de 1-naftilo.
280	R → A	- Mayor actividad enzimática en películas de PET. - Mayor capacidad de degradación del PET y termoestabilidad (14 veces a 40°C) al relacionar con E-121 y H-186.

Fuente: Modificado de UniProt, (2021).

1.8. Objetivos

1.8.1. Objetivo General

- Diseñar y validar primers para la construcción de las variantes mutantes S121E, S121D, D186H y R280A de la enzima PETasa de *Ideonella sakaiensis* mediante tres diferentes métodos de mutagénesis dirigida al sitio.

1.8.2. Objetivos Específicos

- Identificar diferentes métodos de mutagénesis dirigida.
- Diseñar primers para la construcción de las variantes mutantes S121E, S121D, D186H y R280A de la enzima PETasa de *Ideonella sakaiensis* de acuerdo con los métodos seleccionados.
- Validar los primers diseñados mediante herramientas bioinformáticas.

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente proyecto de investigación es de carácter bioinformático y se fundamentó en diseñar y validar primers para la construcción de las variantes mutantes S121E, S121D, D186H y R280A de la *IsPETasa* mediante tres diferentes métodos de mutagénesis dirigida al sitio.

2.1. Materiales

2.1.1. Recursos Tecnológicos

La parte experimental del proyecto de investigación se llevó a cabo utilizando los siguientes recursos tecnológicos (tangibles e intangibles) que se mencionan en la Tabla 3:

Tabla 3. Recursos tecnológicos.

<i>Recurso</i>	<i>Descripción</i>
<i>Computadora Personal</i>	Laptop HP Model 14-bs026la. Intel (R) Core (TM) i5-7200U CPU@ 2.5GHz, Memoria RAM de 8 GB]
<i>Sistema Operativo</i>	Windows 10
<i>Software Bioinformático</i>	Addgene ApE Clustal Omega OligoAnalyzer OligoEvaluator Unipro UGENE

2.2. Métodos

2.2.1. Identificación de métodos de mutagénesis dirigida al sitio

Se realizó una búsqueda y revisión de la literatura para identificar diferentes métodos de mutagénesis dirigida al sitio mediante PCR que proporcionen alta efectividad y fácil aplicación en laboratorio. Para la recopilación de esta información se utilizó sitios web que proporcionan una gran base de datos de búsqueda científica como NCBI, ScienceDirect y PubMed. Los métodos seleccionados presentan la característica de ser ajustables y funcionales en plásmidos para la expresión de proteínas o enzimas (**Laible & Boonrod, 2009**).

2.2.2. Secuencia de *IsPETasa* y variantes mutantes

La secuencia de *IsPETasa* se descargó del archivo digital de Addgene (**Addgene, 2021**) en formato .txt y en Word. La secuencia se encuentra contenida en el plásmido pET21b(+)-*Is*-PETase (entre el promotor y terminador T7) disponible en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología (FCIAB), liderado por la Dra. Liliana Cerda Mejía, docente – investigadora de la FCIAB (**Austin et al., 2018**).

A partir de la secuencia nativa de *IsPETasa* se procedió a definir la modificación de codones necesarios para la introducción de las sustituciones S121E, S121D, D186H y R280A. La traducción de la enzima se realizó empleando ApE (**Wayne, 2021**). Se procedió a introducir la secuencia de la *IsPETasa* en el programa inicial, luego se seleccionó la opción “Translate” contenida en la barra ORFs y finalmente, se establecieron los parámetros en base a nuestras necesidades y se ejecutó la traducción de la secuencia.

La correcta introducción de las sustituciones se confirmó mediante alineamiento múltiple de las secuencias en Clustal Omega (**Madeira et al., 2019**). Los alineamientos se realizaron por separado tanto para secuencias de nucleótidos de cada variante mutante y de la variante silvestre como para sus productos de traducción.

Por consiguiente, se procedió a introducir la secuencia de nucleótidos correspondientes de la *IsPETasa* silvestre (WT) junto con las secuencias de las variantes mutantes con sus respectivas mutaciones S121E, S121D, D186H y R280A. La ejecución de los alineamientos se llevó a cabo con los parámetros establecidos en el programa y de acuerdo con la traducción de ADN o proteína.

2.2.3. Diseño *in silico* de primers para la construcción de las variantes mutantes S121E, S121D, D186H y R280A de la enzima *IsPETasa*

El diseño de los primers para la construcción de las variantes mutantes S121E, S121D, D186H y R280A del plásmido pET21b(+)-*Is*-PETase se llevó a cabo tomando en cuenta los requerimientos específicos de los métodos de mutagénesis dirigida al sitio: QuikChange®, Q5® Site-Directed Mutagenesis y Phusion Site-Directed Mutagenesis. Para el diseño de todos los primers mutagénicos de las variantes mutantes de *IsPETasa* se consideraron los siguientes parámetros: temperatura de fusión o melting, porcentaje de contenido de Guaninas – Citocinas (%GC), tamaño o longitud del primer y la posición de la mutación en el primer (Sabel, 2012).

2.2.4. Cálculo de la temperatura de Melting de cada conjunto de primers

Para el cálculo de la temperatura de melting o fusión (T_m) de los primers forward y reverse para la construcción de las variantes mutantes S121E, S121D, D186H y R280A del plásmido pET21b(+)-*Is*-PETase, se utilizó el software OligoAnalyzer 3.0 de Integrated DNA Technologies (OligoAnalyzer, 2021), mediante la fórmula estimada a partir del modelado de dos estados del vecino más cercano (nearest-neighbor two-state model) que es ajustable a ADN bicatenario cortos (Ecuación 1):

$$\text{Ecuación 1. } T_m (^{\circ}C) = \frac{\Delta H^{\circ}}{\Delta S^{\circ} + R \ln[\text{oligo}]} - 273,15$$

Donde ΔS° (entropía) y ΔH° (entalpía) corresponden a los parámetros de fusión calculados por la secuencia y los parámetros termodinámicos del modelado

mencionado, [oligo] es la concentración molar de un primer (oligonucleótido), R es la constante del gas ideal ($1,987 \text{ cal K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$), y la constante 273,15 transforma la temperatura de °K a °C (Owczarzy et al., 2008).

Una vez establecido el par de primers de las variantes mutantes S121E, S121D, D186H y R280A de *IsPETasa* de cada método de mutagénesis dirigida al sitio, se procedió a ingresar en el programa las secuencias respectivas en dirección 5' – 3'. Se estableció los valores por defecto del conjunto de parámetros del programa para cada primer que corresponden a una concentración de oligo de 0,25 uM y una concentración de iones monovalentes totales (Na^+) de 50 mM, y se ejecutó el programa dando clic en “Analyze” para la obtención de los parámetros mencionados en el diseño de primers.

2.2.5. Validación *in silico* de los par de primers

La validación de los par de primers de las variantes mutantes S121E, S121D, D186H y R280A de *IsPETasa* se llevó a cabo mediante el uso del software OligoAnalyzer 3.0 de Integrated DNA Technologies (OligoAnalyzer, 2021). Para ello, se evaluó los parámetros de estabilidad termodinámica mediante la energía libre de Gibbs (ΔG°) considerando lo siguiente:

- Para la evaluación de horquillas o Hairpins y Autodímeros se procedió a ingresar por separado las secuencias de los primers forward y reverse, y se ejecutó los análisis seleccionando los botones “Hairpin” y “Self-Dimer” respectivamente.
- Para la evaluación de Heterodímeros se insertó las secuencias de ambos primers forward y reverse de cada variante mutante, y se ejecutó el análisis seleccionando la opción “Hetero-Dimer”.

Del mismo modo, para evaluar la calidad de los par de primers de las variantes mutantes *IsPETasa* se realizó un análisis para la formación de estructuras secundarias o la generación de dímeros mediante el programa OligoEvaluator™ (OligoEvaluator™, 2022). Para lo cual, se ingresó las secuencias de cada primer forward y reverse de las variantes mutantes en dirección 5' – 3' y se ejecutó el

programa seleccionando el botón “Calculate”. Se utilizaron los parámetros establecidos por defecto en el software.

Para la verificación de la especificidad de cada conjunto de primers de las variantes mutantes S121E, S121D, D186H y R280A de *IsPETasa* se ejecutó alineamientos con la secuencia nucleotídica de la variante silvestre WT junto con las secuencias de los primers forward y reverse diseñados a partir de cada método de mutagénesis dirigida al sitio (Madeira et al., 2019).

2.2.6. Validación del diseño de primers mediante PCR *in silico*

La evaluación del control de calidad y especificidad de los par de primers de las variantes mutantes S121E, S121D, D186H y R280A de *IsPETasa* se llevó a cabo mediante un ensayo de PCR *in silico*. Para este fin, se utilizó el software Unipro UGENE (Okonechnikov et al., 2012) con el objetivo de calcular los resultados teóricos de la PCR utilizando un conjunto dado de primers para la amplificación de las secuencias de ADN de interés, mediante los siguientes pasos:

a. Se procedió a ingresar la secuencia de ADN lineal del plásmido pET21b(+)-*Is*-PETase en formato .txt, seleccionando la opción “Open” que se encuentra contenida en la barra de herramientas “File”.

b. Se seleccionó la pestaña “*In silico* PCR” del panel de opciones y se procedió a ingresar las secuencias de ADN de los primers forward y reverse de cada variante mutante respectivamente.

c. Se trabajó con los parámetros establecidos por defecto en el programa, considerando el número de modificaciones o mutaciones (mismatches) para cada variante mutante y se eligió un tamaño máximo del producto de amplificación de 7000 pb.

d. Se ejecutó la PCR *in silico* seleccionando el cuadro “Find product(s) anyway” para la obtención de los resultados.

e. Finalmente, se procedió a exportar los productos de PCR obtenidos (amplicones) seleccionando la opción “Extract product(s)”.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Análisis y discusión de datos

3.1.1. Identificación de métodos de mutagénesis dirigida al sitio

Se realizó una revisión de la literatura para la identificación de métodos de MDS que permitan la construcción de las variantes mutantes de *IsPETasa*. En la Tabla 4, se describen diferentes estudios y los métodos aplicados hasta la actualidad. Se identificó once estudios cuyas metodologías aplican técnicas de MDS para la construcción de diferentes variantes mutantes de *IsPETasa*. La mayoría de los estudios (72,72%) aplicaron el kit comercial QuikChange® y el 27,27% utilizaron la técnica Q5® Site-Directed Mutagenesis.

El kit de MDS QuikChange® es una de las metodologías más empleadas debido a que su protocolo suele ser fácil y rápido con la obtención de mutantes con una eficiencia superior al 80%. Además, que esta técnica no requiere de sitios de restricción únicos, plásmidos especializados y procesos de metilación (**H. Liu & Naismith, 2008**).

Tabla 4. Identificación de métodos de mutagénesis dirigida al sitio de *IsPETasa*.

<i>N°</i>	<i>Estudio</i>	<i>Método de MDS</i>	<i>Referencia</i>
1	“Información estructural sobre el mecanismo molecular de la degradación del poli (tereftalato de etileno)”	QuikChange®	Joo et al., (2018)
2	“Caracterización estructural y funcional de polietileno tereftalato hidrolasa de <i>Ideonella sakaiensis</i> ”	QuikChange®	C. Liu et al., (2019)
3	“Cristalografía de proteínas y análisis de mutagénesis directa del sitio de la	QuikChange®	B. Liu et al., (2018)

	poli (tereftalato de etileno) hidrolasa PETasa de <i>Ideonella sakaiensis</i> ”		
4	“Ingeniería racional de proteínas de PETasa termoestable de <i>Ideonella sakaiensis</i> para una degradación de PET altamente eficiente”	QuikChange®	Son et al., (2019)
5	“Caracterización e ingeniería de una poliesterasa aromática degradadora de plásticos”	Q5® Site-Directed Mutagenesis	Austin et al., (2018)
6	Características generales para mejorar la actividad enzimática de la hidrólisis de poli (tereftalato de etileno)	QuikChange®	C. C. Chen et al., (2021)
7	“Conocimiento estructural del mecanismo catalítico de PET hidrolasa”	QuikChange®	Han et al., (2017)
8	“Aceleración de la degradación enzimática de poli (tereftalato de etileno) por revestimiento de superficie con tensioactivos aniónicos”	QuikChange®	Furukawa et al., (2018)
9	“Detección <i>in silico</i> y expresión heteróloga de una enzima similar a polietileno tereftalato hidrolasa (PETasa) (SM14est) con actividad degradadora de policaprolactona (PCL), de la cepa <i>Streptomyces sp.</i> SM14”	Q5® Site-Directed Mutagenesis	Almeida et al., (2019)
10	“Uso de una microalga marina como chasis para la degradación del tereftalato de polietileno (PET)”	Q5® Site-Directed Mutagenesis	Moog et al., (2019)
11	“Ingeniería de proteínas estructural basada en bioinformática de PETasa termoestable de <i>Ideonella sakaiensis</i> ”	QuikChange®	Son et al., (2020)

Para la selección de los métodos de mutagénesis dirigida al sitio se consideró que estos sean ajustables y funcionales en plásmidos para la expresión de proteínas o enzimas. Los métodos seleccionados fueron: QuikChange®, Q5® Site-Directed Mutagenesis y Phusion Site-Directed Mutagenesis.

El kit de MDS QuikChange® se emplea para realizar mutaciones puntuales y para insertar, reemplazar o eliminar aminoácidos adyacentes únicos o múltiples. Esto se lleva a cabo utilizando la ADN polimerasa de alta fidelidad *PfuUltra* (Hf), que permite la replicación mutagénica dirigida por primers de ambas cadenas del plásmido. Además, emplea un procedimiento básico con un vector de ADN bicatenario superenrollado (DNAs) con un fragmento de interés y dos primers sintéticos que contienen la mutación deseada (**H. Liu & Naismith, 2008**).

El kit Q5® Site-Directed Mutagenesis permite una mutagénesis rápida y específica del sitio de ADN plasmídico bicatenario en un tiempo menor a 2 horas. Esta emplea una robusta ADN polimerasa Q5 Hot Start de alta fidelidad con primers mutagénicos tipificados para desarrollar sustituciones, deleciones e inserciones en una diversidad de plásmidos (**Li et al., 2015**).

En el kit Phusion Site-Directed Mutagenesis se puede realizar mutaciones puntuales, deleciones e inserciones en cualquier tipo de ADN plasmídico, ya que emplea una ADN polimerasa de gran procesabilidad, la *Hot Start II* (**Westburg, 2021**). Este procedimiento asegura una alta fidelidad para la amplificación por PCR del plásmido bicatenario permitiendo así la amplificación de plásmidos de mayor tamaño y la reducción de mutaciones secundarias no deseadas.

La metodología o protocolo de las técnicas de MDS seleccionadas se evidencian a continuación en la Tabla 5:

Tabla 5. Descripción general de los métodos de mutagénesis dirigida al sitio.

<i>Método</i>	<i>Pasos</i>	<i>Descripción</i>	<i>Referencia</i>
<i>QuikChange®</i>	1. Síntesis de hebras mutantes	Se realiza un ciclo térmico para: a. Desnaturalizar la plantilla de ADN. b. Hibridación de primers con la mutación deseada. c. Extender los primers con ADN polimerasa <i>PfuUltra</i> .	Agilent Technologies, (2021)
	2. Digestión de la plantilla (<i>Dpn I</i>)	Se digiere el ADN parental metilado y ADN hemimetilado con <i>Dpn I</i> .	
	3. Transformación	Se transforma la molécula mutada en células competentes para la reparación de mellas (nudos).	
<i>Q5® Site-Directed Mutagenesis</i>	1. Amplificación exponencial (PCR)	Se realiza una amplificación exponencial (PCR) utilizando primers estándares y una mezcla maestra formulada de ADN polimerasa <i>Q5 Hot Start High-Fidelity</i> .	New England Biolabs, (2021)
	2. Tratamiento KLD	Se realiza la incubación con una mezcla enzimática única con una quinasa, una ligasa y <i>Dpn I</i> . Esto permite una rápida circularización del producto de la PCR y la eliminación del ADN molde.	
	3. Transformación	Se realiza una transformación de alta eficiencia en células químicamente competentes (no proporcionadas).	
<i>Phusion Site-Directed Mutagenesis</i>	1. Amplificación del plásmido de interés con dos primers fosforilados	Se diseñan primers con la mutación deseada de manera que se anillen espalda con espalda al plásmido.	ThermoScientific, (2021)
	2. Digestión de la plantilla	Se digiere el ADN parental metilado y hemimetilado con FastDigest DpnI.	
	3. Circularización del plásmido por ligadura	Se realiza la circularización de productos de PCR mutados por ligadura con ADN Ligasa T4.	
	4. Transformación	Se realiza la transformación de <i>E. coli</i> con la mezcla de ligación.	

Conjuntamente para la ejecución de los métodos de mutagénesis dirigida al sitio QuikChange®, Q5® Site-Directed Mutagenesis y Phusion Site-Directed Mutagenesis, es necesario el diseño de primers específicos con las mutaciones de interés. Tomando en consideración la metodología general de los MDS, se identificó el procedimiento para el desarrollo de los primers mutagénicos forward y reverse mediante sustituciones, teniendo en cuenta que, para cada método se deben seguir las siguientes consideraciones:

❖ **QuikChange®:**

- Deben tener una longitud de entre 25 – 45 bases, con una temperatura de melting TM menor a 78°C. El uso de primers mayores a 45 bases aumenta la formación de estructuras secundarias.
- Deben tener un contenido mínimo de GC del 40% y deben terminar en una o más bases C o G.
- La mutación deseada (inserción o delección) debe ubicarse en el centro del primer con 10 – 15 nucleótidos a ambos lados.
- Deben contener la mutación deseada y anclarse a la misma secuencia en cadenas opuestas del plásmido (**Agilent Technologies, 2021**).

❖ **Q5® Site-Directed Mutagenesis:**

- Deben diseñarse creando un desajuste en la mitad del primer mutagénico.
- Deben tener una longitud de entre 25 – 45 bases, con una temperatura de melting TM menor a 75°C.
- Deben tener un contenido mínimo de GC del 40% y deben terminar en una o más bases C o G.
- Deben incluir mínimo 10 bases complementarias a su plásmido en el extremo 3' del primer. Para ajustar diversas mutaciones (7 a 50), estas deben incluirse en el extremo 5' del primer.

- El extremo 5' del segundo primer debe comenzar en el nucleótido contiguo al extremo 5' del primer cebador. Este deberá proceder en la dirección opuesta en la hebra complementaria (**New England Biolabs, 2021**).

❖ **Phusion Site-Directed Mutagenesis:**

- Ambos primers deben ser fosforilados en el extremo 5' para eliminar el paso de fosforilación separado antes de la ligación directa.
- Deben ser creadas diseñando un cambio en el primer mutagénico.
- Deben contener una longitud entre 24 – 30 nucleótidos con una temperatura de melting TM menor a 75°C.
- Deben tener un contenido mínimo de GC del 40% y deben terminar en una o más bases C o G.
- La mutación debe ubicarse en la mitad del primer con 10 – 15 bases colocadas a ambos lados.
- El extremo 5' del segundo primer debe comenzar en el nucleótido contiguo al extremo 5' del primer cebador. Este deberá proceder en la dirección opuesta en la hebra complementaria (**ThermoScientific, 2021**).

3.1.2. Obtención de la secuencia de *IsPETasa* y variantes mutantes

Se obtuvo la secuencia de nucleótidos o aminoácidos de la enzima *IsPETasa* a partir de la base de datos de Addgene (Figura 5), con número de secuenciación: n.º 334619 (**Addgene, 2021**). La secuencia de *IsPETasa* presente en el plásmido pET21b(+)-*Is*-PETase sin cola de histidinas contiene 876 nucleótidos que codifican a 292 aminoácidos o residuos (tripleto de codones). Además, en el plásmido pET21b(+)-*Is*-PETase la enzima posee una cola de 6 histidinas cuya ubicación se encuentra en el extremo C terminal que se emplea para su purificación. Para este estudio se excluyó la secuencia de la cola de histidinas debido a que en esta sección no se va a realizar ninguna mutación.

Conjuntamente, el gen que codifica la *IsPETasa* ha sido sometido por un proceso de optimización de codones para su expresión en *E. coli* realizado en el estudio de (Austin et al., 2018) mediante el software de optimización de codones *OPTIMIZER*.

```

1 atgaacttcc cccgtgcctc ggccttatg caggctgctg tgctgggagg cttatggcc
61 gtttccgcag cggccaccgc gcagaccaat cgtatgctg ggggccccaa ccctaccgcc
121 gcctcgttgg aagccagcgc gggacccttt accgttcgta gctttaccgt tagccgtccg
181 tccggatatg gtgcaggac cgtctattac ccaaccaatg caggcggcac cgttggcggc
241 attgcaatcg tccccgggta caccgcgcgt caaagcagca ttaagtggg gggcctccgc
301 ttagctagcc atggctttgt ggttattacc atcgatacga acagcactct agaccagccc
361 agcagccgta gctcgcaaca gatggccgag cttcgtcaag ttgcgagctt gaacgggacc
421 agcagtagcc cgatttacgg aaaggtcgat actgcccgca tgggtgtgat gggctggcca
481 atggggggcg gcggttctact tattagcgc gccgaacaacc cgagtttaa agcagcggca
541 ccgcaggcgc catgggactc ttcaaccaac ttcagcagtg ttaccgtgcc gacgctgatt
601 ttcgcgtgcg agaatgatag cattgcaccg gtgaacagca ggcgcgtgcc gatttatgat
661 agcatgtccc gcaacgcaaa acagtttctg gaaattaacg gcggtagcca ctcttgtgcc
721 aactctggga acagcaacca ggcactgatc ggaaaaaaag ggggtgcatg gatgaaacga
781 ttcattggata atgacaccgc ttactcaacc ttcgcctgtg agaatcccaa cagcacacgc
841 gtgtcggatt ttcgcaccgc gaactgttcc ctcgag

```

Figura 5. Secuencia de nucleótidos de *IsPETasa* presente en el plásmido pET21b(+)-*Is*-PETase sin cola de histidinas.

Fuente: Addgene, (2021).

Para la traducción de la secuencia de nucleótidos de *IsPETasa* se utilizó el programa de ApE (Figura 6) (Wayne, 2021). Se identificó los codones codificantes para los aminoácidos pertenecientes a cada variante mutante S121E, S121D, D186H y R280A que corresponden a AGC, AGC, GAC y CGC respectivamente.


```

1 atg aac ttc ccc cgt gcc tog cgc ctt atg cag gct gct gtg ctg ggc ggc ctt atg gcc 60
1 Met Asn Phe Pro Arg Ala Ser Arg Leu Met Gln Ala Ala Val Leu Gly Gly Leu Met Ala 20

61 gtt tcc gca gcg gcc acc gog cag acc aat ccg tat gog cgc ggc ccc aac cct acc gcc 120
21 Val Ser Ala Ala Ala Thr Ala Gln Thr Asn Pro Tyr Ala Arg Gly Pro Asn Pro Thr Ala 40

121 gcc tog ttg gaa gcc agc gog gga ccc ttt acc gtt cgt agc ttt acc gtt agc cgt ccg 180
41 Ala Ser Leu Glu Ala Ser Ala Gly Pro Phe Thr Val Arg Ser Phe Thr Val Ser Arg Pro 60

181 tcc gga tat ggt gca ggg acc gtc tat tac cca acc aat gca ggc ggc acc gtt ggc gog 240
61 Ser Gly Tyr Gly Ala Gly Thr Val Tyr Tyr Pro Thr Asn Ala Gly Gly Thr Val Gly Ala 80

241 att gca atc gtc ccc ggg tac acc gog cgt caa agc agc att aag tgg tgg ggt ccg cgc 300
81 Ile Ala Ile Val Pro Gly Tyr Thr Ala Arg Gln Ser Ser Ile Lys Trp Trp Gly Pro Arg 100

301 tta gct agc cat ggc ttt gtg gtt att acc atc gat acg aac agc act cta gac cag ccc 360
101 Leu Ala Ser His Gly Phe Val Val Ile Thr Ile Asp Thr Asn Ser Thr Leu Asp Gln Pro 120

361 agc agc cgt agc tog caa cag atg gcc gcg ctt cgt caa gtt gcg agc ttg aac ggg acc 420
121 Ser Ser Arg Ser Ser Gln Gln Met Ala Ala Leu Arg Gln Val Ala Ser Leu Asn Gly Thr 140

421 agc agt agc ccg att tac gga aag gtc gat act gcc cgc atg ggt gtg atg ggc tgg tca 480
141 Ser Ser Ser Pro Ile Tyr Gly Lys Val Asp Thr Ala Arg Met Gly Val Met Gly Trp Ser 160

481 atg ggg ggc ggc ggt tca ctt att agc gcc gcg aac aac ccg agt tta aaa gca gcg gca 540
161 Met Gly Gly Gly Gly Ser Leu Ile Ser Ala Ala Asn Asn Pro Ser Leu Lys Ala Ala Ala 180

541 ccg cag gcg cca tgg gac tct tca acc aac ttc agc agt gtt acc gtg ccg acg ctg att 600
181 Pro Gln Ala Pro Trp Asp Ser Ser Thr Asn Phe Ser Ser Val Thr Val Pro Thr Leu Ile 200

601 ttc gcg tgc gag aat gat agc att gca ccg gtg aac agc agc gcg ctg ccg att tat gat 660
201 Phe Ala Cys Glu Asn Asp Ser Ile Ala Pro Val Asn Ser Ser Ala Leu Pro Ile Tyr Asp 220

661 agc atg tcc cgc aac gca aaa cag ttt ctg gaa att aac ggc ggt agc cac tct tgt gcc 720
221 Ser Met Ser Arg Asn Ala Lys Gln Phe Leu Glu Ile Asn Gly Gly Ser His Ser Cys Ala 240

721 aac tct ggg aac agc aac cag gca ctg atc gga aaa aaa ggg gtt gca tgg atg aaa cga 780
241 Asn Ser Gly Asn Ser Asn Gln Ala Leu Ile Gly Lys Lys Gly Val Ala Trp Met Lys Arg 260

781 ttc atg gat aat gac acc cgt tac tca acc ttc gcc tgt gag aat ccc aac agc aca ccg 840
261 Phe Met Asp Asn Asp Thr Arg Tyr Ser Thr Phe Ala Cys Glu Asn Pro Asn Ser Thr Arg 280

841 gtg tog gat ttt cgc acc gog aac tgt tcc ctc gag 876
281 Val Ser Asp Phe Arg Thr Ala Asn Cys Ser Leu Glu 292

```

Figura 6. Traducción de la secuencia de nucleótidos de *IsPETasa* con ApE. Las mutaciones S121E, S121D, D186H y R280A se encuentran representadas en color.

Fuente: Modificado de Wayne, (2021).

Para la selección de codones para la generación de las variantes mutantes S121E, S121D, D186H y R280A de *IsPETasa* se utilizó la tabla de codones que muestra la frecuencia media y el ratio con la que se emplean diferentes codones en los genes de *E. coli* (Anexos, Figura 18) (Maloy et al., 2002). Las mutaciones S121E, S121D y D186H cuyos aminoácidos glutamato, aspartato e histidina se pueden

codificar con dos codones (Tabla 6). Por otro lado, la mutación R280A para alanina se puede realizar con cuatro codones.

De acuerdo con el análisis de la secuencia de *IsPETasa* se identificó que los codones de sustitución (mutantes) que codifican para la serina S121E, serina S121D, aspartato D186H y arginina R280A son GAA, GAT, CAT y GCG respectivamente. Las mutaciones de cada variante fueron seleccionados en función a los valores más altos de la frecuencia media con la que se utiliza el codón por cada 100 codones (%) y por la abundancia del codón en relación con todos los codones del aminoácido en particular (Ratio). Los resultados obtenidos se encuentran en un rango de valores de abundancia de codones en *E. coli* entre 1.2 – 4.4 % y 0.34 – 0.70 de ratio. Las mutaciones S121E, S121D, D186H y R280A se llevaron a cabo para aumentar la actividad de la enzima *IsPETasa* (Son et al., 2019).

Tabla 6. Selección de codones para la generación de las variantes de *IsPETasa*.

Variante mutante	Codón WT	Codón de la sustitución*	N° de bases que se sustituye	Abundancia de codones en <i>E. coli</i> *	
				Frecuencia media/100 codones (%)	Ratio
S121E	AGC	<u>GAA</u>	3	4.4	0.70
		GAC	2	1.9	0.30
S121D	AGC	<u>GAT</u>	3	3.3	0.59
		GAC	2	2.3	0.41
D186H	GAC	<u>CAT</u>	2	1.2	0.52
		CAC	1	1.1	0.48
R280A	CGC	<u>GCG</u>	3	3.2	0.34
		GCC	2	2.3	0.25
		GCA	3	2.1	0.22
		GCT	3	1.8	0.19

Nota: Los codones que se encuentran marcados con negrilla y subrayados representan los codones seleccionados para las mutaciones de las variantes *IsPETasa*.

Fuente: Tomado de Maloy et al., (2002)*.

De la misma manera, se realizó alineamientos para confirmar la correcta introducción de las mutaciones de las variantes mutantes S121E, S121D, D186H y R280A de *IsPETasa* mediante el software Clustal Omega (Madeira et al., 2019). Los alineamientos se realizaron por separado tanto para las secuencias de nucleótidos de cada variante mutante junto con la secuencia de la variante silvestre *IsPETasa* WT (Figura 7, 8 y 9).

De acuerdo con el análisis obtenido de los alineamientos se evidenció que las mutaciones S121E y S121D (Figura 7) se encuentran alineadas en las ubicaciones de los nucleótidos 361 – 363 con las mutaciones GAA y GAT respectivamente. Así mismo, la alineación de la mutación D186H (Figura 8) se localiza a 556 – 558 nucleótidos de la secuencia de *IsPETasa* por CAT, mientras que la variación R280A a 838 – 840 bases por GCG (Figura 9). De esta manera, gracias a la ejecución de los alineamiento de las variantes mutantes se comprobó que la secuencia de la enzima era la indicada, demostrando así que no existió errores en el algoritmo de Clustal Omega (Sievers & Higgins, 2018).

<i>IsPETasa_WT</i>	atgaacttccccctgcctcgcgccttatgcaggctgctgtgctggggcgccttatggcc	60
<i>IsPETasa_S121E</i>	atgaacttccccctgcctcgcgccttatgcaggctgctgtgctggggcgccttatggcc	60
<i>IsPETasa_S121D</i>	atgaacttccccctgcctcgcgccttatgcaggctgctgtgctggggcgccttatggcc	60

<i>IsPETasa_WT</i>	gtttccgcagcggccaccgcgcagaccaatccgtagcgcgcggcccaaccctaccgcc	120
<i>IsPETasa_S121E</i>	gtttccgcagcggccaccgcgcagaccaatccgtagcgcgcggcccaaccctaccgcc	120
<i>IsPETasa_S121D</i>	gtttccgcagcggccaccgcgcagaccaatccgtagcgcgcggcccaaccctaccgcc	120

<i>IsPETasa_WT</i>	gcctcgttgaagccagcgcgggaccctttaccgttcgtagctttaccgttagcgcgccg	180
<i>IsPETasa_S121E</i>	gcctcgttgaagccagcgcgggaccctttaccgttcgtagctttaccgttagcgcgccg	180
<i>IsPETasa_S121D</i>	gcctcgttgaagccagcgcgggaccctttaccgttcgtagctttaccgttagcgcgccg	180

<i>IsPETasa_WT</i>	tccggatatggtgcagggaccgtctattaccaaccaatgcaggcggcaccgttggcgcg	240
<i>IsPETasa_S121E</i>	tccggatatggtgcagggaccgtctattaccaaccaatgcaggcggcaccgttggcgcg	240
<i>IsPETasa_S121D</i>	tccggatatggtgcagggaccgtctattaccaaccaatgcaggcggcaccgttggcgcg	240

<i>IsPETasa_WT</i>	attgcaatcgtccccgggtacaccgcgcgtcaaagcagcattaagtgtgggggtccgcgc	300

<i>IsPETasa_S121E</i>	attgcaatcgccccgggtacaccgcgctcaaagcagcattaagtggggggccgcgc	300
<i>IsPETasa_S121D</i>	attgcaatcgccccgggtacaccgcgctcaaagcagcattaagtggggggccgcgc *****	300
<i>IsPETasa_WT</i>	ttagctagccatggctttgtggttattaccatcgatacgaacagcactctagaccagccc	360
<i>IsPETasa_S121E</i>	ttagctagccatggctttgtggttattaccatcgatacgaacagcactctagaccagccc	360
<i>IsPETasa_S121D</i>	ttagctagccatggctttgtggttattaccatcgatacgaacagcactctagaccagccc *****	360
<i>IsPETasa_WT</i>	agcagccgtagctcgcaacagatggccgcgcttcgtaagttgcgagcttgaacgggacc	420
<i>IsPETasa_S121E</i>	gaa agcagccgtagctcgcaacagatggccgcgcttcgtaagttgcgagcttgaacgggacc	420
<i>IsPETasa_S121D</i>	gat agcagccgtagctcgcaacagatggccgcgcttcgtaagttgcgagcttgaacgggacc *****	420
<i>IsPETasa_WT</i>	agcagtagcccgatattacgaaaggtcgatactgccgcgatgggtgtgatgggctgggtca	480
<i>IsPETasa_S121E</i>	agcagtagcccgatattacgaaaggtcgatactgccgcgatgggtgtgatgggctgggtca	480
<i>IsPETasa_S121D</i>	agcagtagcccgatattacgaaaggtcgatactgccgcgatgggtgtgatgggctgggtca *****	480
<i>IsPETasa_WT</i>	atggggggcgcggttcaactattagcgcgcaacaacccgagtttaaagcagcggca	540
<i>IsPETasa_S121E</i>	atggggggcgcggttcaactattagcgcgcaacaacccgagtttaaagcagcggca	540
<i>IsPETasa_S121D</i>	atggggggcgcggttcaactattagcgcgcaacaacccgagtttaaagcagcggca *****	540
<i>IsPETasa_WT</i>	ccgcagcgccatgggactcttcaaccaacttcagcagtgttaccgtgccgacgctgatt	600
<i>IsPETasa_S121E</i>	ccgcagcgccatgggactcttcaaccaacttcagcagtgttaccgtgccgacgctgatt	600
<i>IsPETasa_S121D</i>	ccgcagcgccatgggactcttcaaccaacttcagcagtgttaccgtgccgacgctgatt *****	600
<i>IsPETasa_WT</i>	ttcgcgtgagagaatgatagcattgcaccggtgaacagcagcgcgctgccgatttatgat	660
<i>IsPETasa_S121E</i>	ttcgcgtgagagaatgatagcattgcaccggtgaacagcagcgcgctgccgatttatgat	660
<i>IsPETasa_S121D</i>	ttcgcgtgagagaatgatagcattgcaccggtgaacagcagcgcgctgccgatttatgat *****	660
<i>IsPETasa_WT</i>	agcatgtcccgaacgcaaaacagtttctgaaattaacggcggtagccactcttgtgcc	720
<i>IsPETasa_S121E</i>	agcatgtcccgaacgcaaaacagtttctgaaattaacggcggtagccactcttgtgcc	720
<i>IsPETasa_S121D</i>	agcatgtcccgaacgcaaaacagtttctgaaattaacggcggtagccactcttgtgcc *****	720
<i>IsPETasa_WT</i>	aactctgggaacagcaaccaggcactgatcgaaaaaaaggggttgcattggatgaaacga	780
<i>IsPETasa_S121E</i>	aactctgggaacagcaaccaggcactgatcgaaaaaaaggggttgcattggatgaaacga	780
<i>IsPETasa_S121D</i>	aactctgggaacagcaaccaggcactgatcgaaaaaaaggggttgcattggatgaaacga *****	780
<i>IsPETasa_WT</i>	ttcatggataatgacaccggttactcaaccttcgcctgtgagaatccaacagcacacgc	840
<i>IsPETasa_S121E</i>	ttcatggataatgacaccggttactcaaccttcgcctgtgagaatccaacagcacacgc	840
<i>IsPETasa_S121D</i>	ttcatggataatgacaccggttactcaaccttcgcctgtgagaatccaacagcacacgc *****	840

```

IsPETasa_WT      gtgtcggatTTTtgcaccgcgaactgttcctcgag      876
IsPETasa_S121E  gtgtcggatTTTtgcaccgcgaactgttcctcgag      876
IsPETasa_S121D  gtgtcggatTTTtgcaccgcgaactgttcctcgag      876
*****

```

Figura 7. Alineamiento múltiple de las secuencias de nucleótidos de las variantes *IsPETasa* WT, S121E y S121D. Las mutaciones se encuentran representadas de color.

Fuente: Madeira et al., (2019).

```

IsPETasa_WT      atgaacttccccgtgcctcgcgccttatgcaggctgctgtgctggcgcccttatggcc      60
IsPETasa_D186H  atgaacttccccgtgcctcgcgccttatgcaggctgctgtgctggcgcccttatggcc      60
*****
IsPETasa_WT      gtttccgcagcggccaccgcgcagaccaatccgtatgcgcgcgccccaacctaccgcc      120
IsPETasa_D186H  gtttccgcagcggccaccgcgcagaccaatccgtatgcgcgcgccccaacctaccgcc      120
*****
IsPETasa_WT      gcctcgttgaagccagcgcgggaccctttaccgttcgtagctttaccgtagccgtccg      180
IsPETasa_D186H  gcctcgttgaagccagcgcgggaccctttaccgttcgtagctttaccgtagccgtccg      180
*****
IsPETasa_WT      tccggatatggtgcagggaccgtctattaccaaccaatgcaggcggcaccgttgcgcg      240
IsPETasa_D186H  tccggatatggtgcagggaccgtctattaccaaccaatgcaggcggcaccgttgcgcg      240
*****
IsPETasa_WT      attgcaatcgtccccgggtacaccgcgcgtcaagcagcattaagtgggggtccgcgc      300
IsPETasa_D186H  attgcaatcgtccccgggtacaccgcgcgtcaagcagcattaagtgggggtccgcgc      300
*****
IsPETasa_WT      ttagctagccatggctttgtggttattaccatcgatacgaacagcactctagaccagccc      360
IsPETasa_D186H  ttagctagccatggctttgtggttattaccatcgatacgaacagcactctagaccagccc      360
*****
IsPETasa_WT      agcagccgtagctcgcaacagatggccgcgcttcgtcaagttgcgagcttgaacgggacc      420
IsPETasa_D186H  agcagccgtagctcgcaacagatggccgcgcttcgtcaagttgcgagcttgaacgggacc      420
*****
IsPETasa_WT      agcagtagcccgatttacgaaaggtcgatactgcccgcatgggtgtgatgggctggtca      480
IsPETasa_D186H  agcagtagcccgatttacgaaaggtcgatactgcccgcatgggtgtgatgggctggtca      480
*****
IsPETasa_WT      atggggggcggcggttcaactattagcgcgcgcaacaaccogagtttaaagcagcggca      540
IsPETasa_D186H  atggggggcggcggttcaactattagcgcgcgcaacaaccogagtttaaagcagcggca      540
*****

```

<i>IsPETasa_WT</i>	ccgcagcgcgccatgggactcttcaaccaacttcagcagtggtaccgtgccgacgctgatt	600
<i>IsPETasa_D186H</i>	ccgcagcgcgccatgg ca tcttcaaccaacttcagcagtggtaccgtgccgacgctgatt	600
	***** * *****	
<i>IsPETasa_WT</i>	ttcgcgtgcgagaatgatagcattgcaccggtgaacagcagcgcgctgccgatttatgat	660
<i>IsPETasa_D186H</i>	ttcgcgtgcgagaatgatagcattgcaccggtgaacagcagcgcgctgccgatttatgat	660

<i>IsPETasa_WT</i>	agcatgtcccgcaacgcaaacagtttctggaattaacggcggtagccactcttgtgccc	720
<i>IsPETasa_D186H</i>	agcatgtcccgcaacgcaaacagtttctggaattaacggcggtagccactcttgtgccc	720

<i>IsPETasa_WT</i>	aactctgggaacagcaaccaggcactgatcggaaaaaaggggttgcattggaacga	780
<i>IsPETasa_D186H</i>	aactctgggaacagcaaccaggcactgatcggaaaaaaggggttgcattggaacga	780

<i>IsPETasa_WT</i>	ttcatggataatgacaccggttactcaaccttcgcctgtgagaatccaacagcacacgc	840
<i>IsPETasa_D186H</i>	ttcatggataatgacaccggttactcaaccttcgcctgtgagaatccaacagcacacgc	840

<i>IsPETasa_WT</i>	gtgtcggattttcgcaccgcaactgttccctcgag	876
<i>IsPETasa_D186H</i>	gtgtcggattttcgcaccgcaactgttccctcgag	876

Figura 8. Alineamiento múltiple de las secuencias de nucleótidos de las variantes *IsPETasa* WT y D186H. Las mutaciones se encuentran representadas de color.

Fuente: Madeira et al., (2019).

<i>IsPETasa_WT</i>	atgaacttccccgcgtgcctcgcgccttatgcaggctgctgtgctggcggccttatggcc	60
<i>IsPETasa_R280A</i>	atgaacttccccgcgtgcctcgcgccttatgcaggctgctgtgctggcggccttatggcc	60

<i>IsPETasa_WT</i>	gtttccgcagcggccaccgcgcagaccaatccgtatgcgcgcgccccaacctaccgcc	120
<i>IsPETasa_R280A</i>	gtttccgcagcggccaccgcgcagaccaatccgtatgcgcgcgccccaacctaccgcc	120

<i>IsPETasa_WT</i>	gcctcgttgaagccagcgcgggaccctttaccggttcgtagctttaccggttagccgtccg	180
<i>IsPETasa_R280A</i>	gcctcgttgaagccagcgcgggaccctttaccggttcgtagctttaccggttagccgtccg	180

<i>IsPETasa_WT</i>	tccggatatggtgcagggaccgtctattaccaaccaatgcaggcggcaccggtggcgcg	240
<i>IsPETasa_R280A</i>	tccggatatggtgcagggaccgtctattaccaaccaatgcaggcggcaccggtggcgcg	240

<i>IsPETasa_WT</i>	attgcaatcgtccccgggtacaccgcgctcaaagcagcattaagtgggggtccgcgc	300
<i>IsPETasa_R280A</i>	attgcaatcgtccccgggtacaccgcgctcaaagcagcattaagtgggggtccgcgc	300

<i>IsPETasa_WT</i>	ttagctagccatggctttgtggttattaccatcgatacgaacagcactctagaccagccc	360
<i>IsPETasa_R280A</i>	ttagctagccatggctttgtggttattaccatcgatacgaacagcactctagaccagccc	360

<i>IsPETasa_WT</i>	agcagccgtagctcgcaacagatggccgcgcttcgtcaagttgcgagcttgaacgggacc	420
<i>IsPETasa_R280A</i>	agcagccgtagctcgcaacagatggccgcgcttcgtcaagttgcgagcttgaacgggacc	420

<i>IsPETasa_WT</i>	agcagtagcccgatttacgaaaggtcgatactgcccgcatgggtgtgatgggctggtca	480
<i>IsPETasa_R280A</i>	agcagtagcccgatttacgaaaggtcgatactgcccgcatgggtgtgatgggctggtca	480

<i>IsPETasa_WT</i>	atggggggcgcggttcacttattagcgcgcaacaaccgagtttaaagcagcggca	540
<i>IsPETasa_R280A</i>	atggggggcgcggttcacttattagcgcgcaacaaccgagtttaaagcagcggca	540

<i>IsPETasa_WT</i>	ccgcagcgccatgggactctcaaccaacttcagcaggttacctgcccagcgtgatt	600
<i>IsPETasa_R280A</i>	ccgcagcgccatgggactctcaaccaacttcagcaggttacctgcccagcgtgatt	600

<i>IsPETasa_WT</i>	ttcgcgtgcgagaatgatagcattgcaccggtgaacagcagcgcgctgccgatttatgat	660
<i>IsPETasa_R280A</i>	ttcgcgtgcgagaatgatagcattgcaccggtgaacagcagcgcgctgccgatttatgat	660

<i>IsPETasa_WT</i>	agcatgtcccgcaacgcaaaacagtttctggaattaacggcggtagccactcttgtgcc	720
<i>IsPETasa_R280A</i>	agcatgtcccgcaacgcaaaacagtttctggaattaacggcggtagccactcttgtgcc	720

<i>IsPETasa_WT</i>	aactctgggaacagcaaccaggcactgatcgaaaaaaaggggttgcattgatgaaacga	780
<i>IsPETasa_R280A</i>	aactctgggaacagcaaccaggcactgatcgaaaaaaaggggttgcattgatgaaacga	780

<i>IsPETasa_WT</i>	ttcatggataatgacaccggttactcaacctcgcctgtgagaatcccaacagcacacgc	840
<i>IsPETasa_R280A</i>	ttcatggataatgacaccggttactcaacctcgcctgtgagaatcccaacagcaca gcc	840

<i>IsPETasa_WT</i>	gtgtcggatthtcgcaccgcaactgttcctcgag	876
<i>IsPETasa_R280A</i>	gtgtcggatthtcgcaccgcaactgttcctcgag	876

Figura 9. Alineamiento múltiple de las secuencias de nucleótidos de las variantes *IsPETasa* WT y D186H. Las mutaciones se encuentran representadas de color.

Fuente: Madeira et al., (2019).

En la Figura 10 se observa la verificación de la traducción de las secuencias de nucleótidos de las variantes mutantes S121E, S121D, D186H y R280A de *IsPETasa* (Wayne, 2021). Se comprobó que con la traducción de las sustituciones de los

aminoácidos en estas posiciones generan las mutaciones S121E a glutamato, S121D a aspartato, D186H a histidina y R280A a alanina respectivamente.



Figura 10. Traducción de las secuencias de nucleótidos de las variantes mutantes S121E, S121D, D186H y R280A de *IsPETasa*. A. S121E; B. S121D; C. D186H; D. R280A.

Fuente: Wayne, (2021).

Para la verificación de los alineamientos de las secuencias de nucleótidos de las variantes mutantes S121E, S121D, D186H y R280A de *IsPETasa* se realizó un alineamiento múltiple a proteína con Clustal Omega (Madeira et al., 2019). En la Figura 11, se representan las mutaciones que codifican para los aminoácidos S121E, S121D, D186H y R280A, de esta manera se corrobora que no existió errores en el algoritmo de Clustal Omega.


```

IsPETasa_WT      MNFFRASRLMQAAVLGGLMAVSAATAQTNPYARGPNPTAASLEASAGPFTVRSFTVSRP 60
IsPETasa_S121E  MNFFRASRLMQAAVLGGLMAVSAATAQTNPYARGPNPTAASLEASAGPFTVRSFTVSRP 60
IsPETasa_S121D  MNFFRASRLMQAAVLGGLMAVSAATAQTNPYARGPNPTAASLEASAGPFTVRSFTVSRP 60
IsPETasa_D186H  MNFFRASRLMQAAVLGGLMAVSAATAQTNPYARGPNPTAASLEASAGPFTVRSFTVSRP 60
IsPETasa_R280A  MNFFRASRLMQAAVLGGLMAVSAATAQTNPYARGPNPTAASLEASAGPFTVRSFTVSRP 60
*****

IsPETasa_WT      SGYGAGTVYYPTNAGGTVGAI AIVPGYTARQSSIKWWGPRASHGFVVITIDTNSTLDQP 120
IsPETasa_S121E  SGYGAGTVYYPTNAGGTVGAI AIVPGYTARQSSIKWWGPRASHGFVVITIDTNSTLDQP 120
IsPETasa_S121D  SGYGAGTVYYPTNAGGTVGAI AIVPGYTARQSSIKWWGPRASHGFVVITIDTNSTLDQP 120
IsPETasa_D186H  SGYGAGTVYYPTNAGGTVGAI AIVPGYTARQSSIKWWGPRASHGFVVITIDTNSTLDQP 120
IsPETasa_R280A  SGYGAGTVYYPTNAGGTVGAI AIVPGYTARQSSIKWWGPRASHGFVVITIDTNSTLDQP 120
*****

IsPETasa_WT      SSRSSQMAALRQVASLNGTSSSPIYGVKVD TARMGVMGWSMGGGSLISAANNPSLKAAA 180
IsPETasa_S121E  SSRSSQMAALRQVASLNGTSSSPIYGVKVD TARMGVMGWSMGGGSLISAANNPSLKAAA 180
IsPETasa_S121D  SSRSSQMAALRQVASLNGTSSSPIYGVKVD TARMGVMGWSMGGGSLISAANNPSLKAAA 180
IsPETasa_D186H  SSRSSQMAALRQVASLNGTSSSPIYGVKVD TARMGVMGWSMGGGSLISAANNPSLKAAA 180
IsPETasa_R280A  SSRSSQMAALRQVASLNGTSSSPIYGVKVD TARMGVMGWSMGGGSLISAANNPSLKAAA 180
*****

IsPETasa_WT      PQAPWDSSTNFSSVTVPTLIFACENDS IAPVNSSALPIYDSMSRNAKQFLEINGGSHSCA 240
IsPETasa_S121E  PQAPWDSSTNFSSVTVPTLIFACENDS IAPVNSSALPIYDSMSRNAKQFLEINGGSHSCA 240
IsPETasa_S121D  PQAPWDSSTNFSSVTVPTLIFACENDS IAPVNSSALPIYDSMSRNAKQFLEINGGSHSCA 240
IsPETasa_D186H  PQAPWDSSTNFSSVTVPTLIFACENDS IAPVNSSALPIYDSMSRNAKQFLEINGGSHSCA 240
IsPETasa_R280A  PQAPWDSSTNFSSVTVPTLIFACENDS IAPVNSSALPIYDSMSRNAKQFLEINGGSHSCA 240
*****

IsPETasa_WT      NSGNSNQALIGKKGVAWMKRFMDNDTRYSTFACENPNSTRVSDFRTANC SLE 292
IsPETasa_S121E  NSGNSNQALIGKKGVAWMKRFMDNDTRYSTFACENPNSTRVSDFRTANC SLE 292
IsPETasa_S121D  NSGNSNQALIGKKGVAWMKRFMDNDTRYSTFACENPNSTRVSDFRTANC SLE 292
IsPETasa_D186H  NSGNSNQALIGKKGVAWMKRFMDNDTRYSTFACENPNSTRVSDFRTANC SLE 292
IsPETasa_R280A  NSGNSNQALIGKKGVAWMKRFMDNDTRYSTFACENPNSTRVSDFRTANC SLE 292
*****

```

Figura 11. Alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de las variantes mutantes S121E, S121D, D186H y R280A de *IsPETasa*. Los cambios apropiados de los aminoácidos de cada variante mutante se representa en color.

Fuente: Madeira et al., (2019).

3.1.3. Diseño *in silico* de primers para la construcción de las variantes mutantes S121E, S121D, D186H y R280A de la enzima *IsPETasa*

Se diseñaron primers para la construcción de las variantes mutantes S121E, S121D, D186H y R280A del plásmido pET21b(+)-*Is*-PETase. Todos los primers de las variantes mutantes de *IsPETasa* fueron establecidos mediante códigos para su respectivo análisis y estos fueron diseñados considerando los siguientes parámetros: una longitud del primer de 18 a 27 nucleótidos, una T_m de 60 – 70 °C con una ΔT_m máximo de 5°C para cada par de primer y un %GC de 40 – 60%.

En la Tabla 7, se detallan los 12 pares de primers de cada uno de los métodos de mutagénesis dirigida al sitio QuikChange®, Q5® Site-Directed Mutagenesis y Phusion Site-Directed Mutagenesis respectivamente. Para el diseño de los primers forward, las mutaciones respectivas de las variantes *IsPETasa* se encuentran ubicadas

en el centro. No obstante, el extremo 5' de los primers forward por el método Phusion Site-Directed Mutagenesis se encuentran fosforilados para excluir la necesidad de un paso de fosforilación por separado antes de la ligadura directa (**ThermoScientific, 2021**).

Para el diseño de los primers reverse por el método QuikChange® corresponden a la secuencia complementaria de los primers forward. Así mismo, el diseño de los primers reverse por los métodos Q5® Site-Directed Mutagenesis y Phusion Site-Directed Mutagenesis se obtuvieron de la cadena complementaria a partir de la base próxima al extremo 5' de cada primer forward. Cada conjunto de primers forward y reverse poseen una longitud de 27 bases o nucleótidos, lo cual indican que cumplen las condiciones establecidas en los parámetros para el diseño de los primers para cada kit comercial de mutagénesis dirigida al sitio.

Tabla 7. Diseño de primers para la construcción de las variantes mutantes *IsPETasa* mediante los métodos de mutagénesis dirigida al sitio.

<i>Método</i>	<i>Variante mutante</i>	<i>Diseño de Primers</i>	<i>Código del primer</i>	<i>Longitud (bases)</i>	<i>Tm (°C)</i>	<i>GC (%)</i>
<i>QuikChange®</i>	S121E	Forward: 5' CTA GAC CAG CCC <u>GAA</u> AGC CGT AGC TCG 3'	S121E-FQC	27	65,6	63,0
		Reverse: 5' CGA GCT ACG GCT TTC GGG CTG GTC TAG 3'	S121E-RQC	27	65,6	63,0
	S121D	Forward: 5' CTA GAC CAG CCC <u>GAT</u> AGC CGT AGC TCG 3'	S121D-FQC	27	65,6	63,0
		Reverse: 5' CGA GCT ACG GCT ATC GGG CTG GTC TAG 3'	S121D-RQC	27	65,0	63,0
	D186H	Forward: 5' CAG GCG CCA TGG <u>CAT</u> TCT TCA ACC AAC 3'	D186H-FQC	27	64,3	55,6
		Reverse: 5' GTT GGT TGA AGA ATG CCA TGG CGC CTG 3'	D186H-RQC	27	64,3	55,6
	R280A	Forward: 5' CCC AAC AGC ACA <u>GCG</u> GTG TCG GAT TTT 3'	R280A-FQC	27	65,1	55,6
		Reverse: 5' AAA ATC CGA CAC CGC TGT GCT GTT GGG 3'	R280A-RQC	27	65,1	55,6
<i>Q5® Site-Directed Mutagenesis</i>	S121E	Forward: 5' CTA GAC CAG CCC <u>GAA</u> AGC CGT AGC TCG 3'	S121E-FQ5	27	65,6	63,0
		Reverse: 5' AGT GCT GTT CGT ATC GAT GGT AAT AAC 3'	S121E-RQ5	27	56,7	40,7
	S121D	Forward: 5' CTA GAC CAG CCC <u>GAT</u> AGC CGT AGC TCG 3'	S121D-FQ5	27	65,6	63,0
		Reverse: 5' AGT GCT GTT CGT ATC GAT GGT AAT AAC 3'	S121D-RQ5	27	56,7	40,7
	D186H	Forward: 5' CAG GCG CCA TGG <u>CAT</u> TCT TCA ACC AAC 3'	D186H-FQ5	27	64,3	55,6
		Reverse: 5' CGG TGC CGC TGC TTT TAA ACT CGG GTT 3'	D186H-RQ5	27	65,2	55,6
	R280A	Forward: 5' CCC AAC AGC ACA <u>GCG</u> GTG TCG GAT TTT 3'	R280A-FQ5	27	65,1	55,6

<i>Phusion Site-Directed Mutagenesis</i>		Reverse: 5' ATT CTC ACA GGC GAA GGT TGA GTA ACG 3'	R280A-RQ5	27	60,4	48,1
	S121E	Forward: 5'P CTA GAC CAG CCC <u>GAA</u> AGC CGT AGC TCG 3'	S121E-FPH	27	65,6	63,0
		Reverse: 5'P AGT GCT GTT CGT ATC GAT GGT AAT AAC 3'	S121E-RPH	27	56,7	40,7
	S121D	Forward: 5'P CTA GAC CAG CCC <u>GAT</u> AGC CGT AGC TCG 3'	S121E-FPH	27	65,6	63,0
		Reverse: 5'P AGT GCT GTT CGT ATC GAT GGT AAT AAC 3'	S121E-RPH	27	56,7	40,7
	D186H	Forward: 5'P CAG GCG CCA TGG <u>CAT</u> TCT TCA ACC AAC 3'	D186H-FPH	27	64,3	55,6
		Reverse: 5'P CGG TGC CGC TGC TTT TAA ACT CGG GTT 3'	D186H-RPH	27	65,2	55,6
	R280A	Forward: 5'P CCC AAC AGC ACA <u>GCG</u> GTG TCG GAT TTT 3'	R280A-FPH	27	65,1	55,6
		Reverse: 5'P ATT CTC ACA GGC GAA GGT TGA GTA ACG 3'	R280A-RPH	27	60,4	48,1

Nota: Los codones que se encuentran marcados con negrilla y subrayados representan las mutaciones de las variantes *IsPETasa*.

3.1.4. Análisis del cálculo de la temperatura de Melting de cada par de primers

El cálculo de la temperatura de melting de los primers forward y reverse para la construcción de las variantes mutantes S121E, S121D, D186H y R280A del plásmido pET21b(+)-*Is*-PETas se llevó a cabo con el software OligoAnalyzer 3.0 de Integrated DNA Technologies (**OligoAnalyzer, 2021**).

En la Tabla 7, se detalla los resultados obtenidos del diseño de los primers mediante los métodos de mutagénesis dirigida al sitio. Por el método QuikChange®, cada conjunto de primers de las variantes mutantes *Is*PETasa se encuentran en un rango de valores de T_m entre 64,3 – 65,6 °C, con un contenido de %GC entre 55,6 – 63,0. De acuerdo con los valores obtenidos se cumplen los parámetros para un diseño exitoso de primers para mutagénesis dirigida al sitio, ya que estos se encuentran dentro de los rangos establecidos con una T_m menor a 70°C y un contenido mínimo de 40% GC, así como valores de ΔT_m entre cada par de primers no mayor a 5°C (**Agilent Technologies, 2021**).

De la misma manera, los resultados obtenidos son óptimos para una PCR convencional con parámetros de diseño que corresponden a una T_m de 55 – 65 °C y un %GC de 40 – 60% (**Singh & Kumar, 2001**). No obstante, los primers S121E-FQC, S121E-RQC, S121D-FQC y S121D-RQC no cumplen con las condiciones mencionadas. Sin embargo, cabe mencionar que los valores obtenidos de dichos primers no se encuentran en un rango muy lejano para una PCR convencional eficiente.

Conjuntamente, en la Tabla 7 se puede evidenciar los resultados obtenidos del cálculo de la T_m de los primers diseñados por los métodos Q5® Site-Directed Mutagenesis y Phusion Site-Directed Mutagenesis respectivamente. Los primers mutagénicos de todas las variantes *Is*PETasa por dichos métodos exhiben los mismos resultados. Cada par de primers se encuentran en un rango de valores de T_m de 56,7 a 65,6 °C y % GC de 40,7 a 63,0%. Por ambos métodos, los primers se encuentran dentro de los parámetros establecidos para el diseño de cebadores por mutagénesis dirigida al sitio. No obstante, los par de primers S121E-FQ5 y S121E-RQ5; S121D-FQ5 y S121D-RQ5; S121E-FPH y S121E-RPH; S121D-FPH y S121D-RPH poseen una

ΔT_m mayor a 5 °C, lo que puede afectar la eficiencia de hibridación de los mismos (**Bench, 2019**).

De la misma manera, los resultados obtenidos en el diseño de los primers por los métodos Q5® Site-Directed Mutagenesis y Phusion Site-Directed Mutagenesis son posibles para la aplicación de una PCR convencional, ya que la mayoría de los primers presentan valores establecidos en los parámetros de diseño que corresponden a una T_m de 55 – 65 °C y un %GC de 40 – 60% (**Singh & Kumar, 2001**). A excepción de los primers S121E-RQ5, S121D-RQ5, S121E-RPH y S121D-RPH que poseen un %GC mayor al 60%, esta condición puede originar la formación de dímeros (**Bench, 2019**).

Por otra parte, se obtuvo que, únicamente el par de primer R280A-FQC y R280A-RQC poseen una secuencia repetitiva de 4 nucleótidos TTTT y AAAA respectivamente. Así mismo, los primers R280A-FQ5, R280A-FPH, D186H-RQ5 y D186H-RPH conservan una secuencia repetitiva TTTT. Este análisis puede representar una hibridación deficiente de los primers; sin embargo, es aceptable un número máximo de secuencias repetidas de hasta 4 pb en la secuencia del primer (**PREMIER BIOSOFT, 2022**).

3.1.5. Validación *in silico* de los pares de primers

La validación de los pares de primers de las variantes mutantes S121E, S121D, D186H y R280A de *IsPETasa* se llevó a cabo con el software OligoAnalyzer 3.0 de Integrated DNA Technologies (**OligoAnalyzer, 2021**). En este programa se evaluaron los parámetros de estabilidad termodinámica (ΔG°) que pueden ocurrir de las interacciones entre los primers como son la formación de estructuras secundarias: horquillas o Hairpins, autodímeros y heterodímeros.

La Tabla 8 representa los resultados obtenidos de los primers forward por los métodos de mutagénesis dirigida al sitio QuikChange®, Q5® Site-Directed Mutagenesis y Phusion Site-Directed Mutagenesis, ya que presentan el mismo diseño de primers entre cada variante mutante. De acuerdo con un análisis minucioso los resultados indican que los primers forward S121D, D186H y R280A pueden ostentar

la formación de 3 horquillas mientras que el S121E de 4. Así mismo, las estructuras secundarias de todos los primers poseen valores de T_m que oscilan entre 26,8 – 45,1 °C. Estos resultados no representan ningún problema, ya que, según **Owczarzy et al., (2008)**, para evitar la formación de estructuras secundarias la T_m de la horquilla más estable debe ser al menos 50°C o ser menor a la temperatura de annealing (hibridación) o a la temperatura a la cual se empleará el primer para la reacción de PCR.

Tabla 8. Análisis de los parámetros de estabilidad termodinámica de los primers forward de las variantes mutantes *IsPETasa* mediante los métodos QuikChange®, Q5® Site-Directed Mutagenesis y Phusion Site-Directed Mutagenesis.

<i>Primers</i>	<i>Horquilla</i>	<i>T_m para la horquilla (°C)</i>	<i>Autodímeros/ Self-dimer (ΔG°) (kcal/mol)</i>	<i>Heterodímeros/ Cross-dimer (ΔG°) (kcal/mol)</i>
<i>S121E-FQC, S121E-FQ5 y S121E-FPH</i>	1	34,6	-6,34	-7,81*
	2	44,7		
	3	33,8		
	4	26,8		
<i>S121D-FQC, S121D-FQ5 y S121D-FPH</i>	1	45,1	-6,34	-7,81*
	2	34,6		
	3	33,8		
<i>D186H-FQC, D186H-FQ5 y D186H-FPH</i>	1	39,5	-17,8	-6,21*
	2	34,8		
	3	30,7		
<i>R280A-FQC, R280A-FQ5 y R280A-FPH</i>	1	40,6	-3,61	-8,03*
	2	36,3		
	3	34,7		

*Valores de heterodímeros obtenidos de los primers Forward y Reverse por el método QuikChange® (valor ΔG° de la más estable para la formación de dicha estructura).

**Valores de heterodímeros obtenidos de los primers Forward y Reverse por los métodos Q5® Site-Directed Mutagenesis y Phusion Site-Directed Mutagenesis (valor ΔG° de la más estable para la formación de dicha estructura).

De la misma manera, en la Tabla 9 se puede evidenciar los resultados alcanzados para la formación de horquillas de los primers reverse por los métodos de mutagénesis dirigida al sitio. Mediante el método QuikChange® los resultados indican la posible formación de 5 horquillas en los primers de las variantes S121D y D186H, mientras que los primers S121E y R280A presentan un número de 3 y 4 respectivamente.

Por los métodos Q5® Site-Directed Mutagenesis y Phusion Site-Directed Mutagenesis al poseer los mismos diseños de primers reverse (con la diferencia de que los extremos 5' de los primers por el método Phusion se encuentran fosforilados), se obtuvieron que los primers de las variantes D186H y R280A pueden presentar la formación de 2 horquillas, mientras que S121E y S121D de 3. Los valores de T_m para las horquillas de todos los primers reverse permanecen en un rango de 19,2 – 50,2 °C siendo menores a las T_m calculadas en el apartado anterior, lo cual nos indica que no existirá la formación de horquillas en el proceso de la PCR mutagénica (Owczarzy et al., 2008).

Tabla 9. Análisis de los parámetros de estabilidad termodinámica de los primers reverse de las variantes mutantes *IsPETasa* mediante los métodos de mutagénesis dirigida al sitio.

<i>Método</i>	<i>Primer</i>	<i>Horquilla o Hairpin</i>	<i>T_m para la horquilla (°C)</i>	<i>Autodímeros/ Self-dimer (ΔG) (kcal/mol)</i>
<i>QuikChange®</i>	S121E-RQC	1	39,7	-6,34
		2	41,3	
		3	49,5	
	S121D-RQC	1	39,7	-6,34
		2	50,2	
		3	36,7	
		4	37,4	
		5	34,1	
	D186H-RQC	1	34,7	-17,8
		2	29,1	
		3	26,5	
		4	23,7	
		5	20,9	

<i>Q5® Site-Directed Mutagenesis y Phusion Site-Directed Mutagenesis</i>	R280A-RQC	1	40,1	-3,61
		2	34,9	
		3	28,9	
		4	30,8	
	S121E-RQ5, S121E-RPH, S121D-RQ5 y S121D-RPH	1	27,8	-9,71
		2	23,4	
		3	19,2	
	D186H-RQ5 y D186H-RPH	1	39,5	-8,74
		2	32,2	
	R280A-RQ5 y R280A-RPH	1	32,5	-5,13
		2	25,7	

Conjuntamente, en la Tabla 8 y 9 se puede evidenciar los resultados obtenidos del análisis de autodímeros de los primers forward y reverse de las variantes mutantes de *IsPETasa*. Los valores de ΔG° de los primers forward por todos los métodos QuikChange®, Q5® Site-Directed Mutagenesis y Phusion Site-Directed Mutagenesis se encuentran en un rango de -17,8 a -3,61 kcal/mol. De igual forma, se alcanzaron los mismos resultados en los primers reverse por el método QuikChange®, mientras que mediante los métodos Q5® Site-Directed Mutagenesis y Phusion Site-Directed Mutagenesis los valores oscilan entre -9,71 a -5,13 kcal/mol.

Con base a lo planteado en el estudio realizado por **Pazdernik, (2012)**, recomienda que, para un diseño óptimo, los valores de ΔG° para el análisis de autodímeros y heterodímeros deben estar entre 0 a -9 kcal/mol o ser mayor a -9 kcal/mol. En base a esto y de acuerdo con el análisis obtenido, los primers D186H-FQC, D186H-FQ5, D186H-FPH, S121E-RQ5, S121E-RPH, S121D-RQ5 y S121D-PH poseen valores de ΔG° menores a -9 kcal/mol, lo cual nos indica la posible formación de estructuras secundarias autocomplementarias (horquillas) o de dúplex cuando los primers se hibriden consigo mismo (autodímeros) que pueden alterar adversamente las reacciones de PCR. Sin embargo, los resultados obtenidos no muestran valores excesivamente altos y es importante tomar en cuenta que estos primers presentan valores de T_m para horquillas mucho menores a las temperaturas a las cuales se van a emplear, por lo que no existirá la formación de horquillas y autodímeros en la PCR mutagénica (**Owczarzy et al., 2008**).

Por otra parte, para la evaluación de heterodímeros entre los primers forward y reverse de las variantes mutantes de *IsPETasa* (Tabla 8), se consideró el valor ΔG° más estable para la formación de cada dímero respectivamente. Se obtuvieron valores de ΔG° entre -8,03 a -6,21 kcal/mol mediante el método QuikChange®, y de -8,16 a -5,24 kcal/mol por los métodos Q5® Site-Directed Mutagenesis y Phusion Site-Directed Mutagenesis. De acuerdo con el análisis obtenido, todos los primers poseen valores de ΔG° superiores a -9 kcal/mol cumpliendo con lo mencionado por **Pazdernik, (2012)**.

Del mismo modo, para evaluar la calidad de los par de primers de las variantes mutantes *IsPETasa* se realizó un análisis para la formación de estructuras secundarias y la generación de dímeros mediante el programa OligoEvaluator™ (**OligoEvaluator™, 2022**). Todos los métodos de mutagénesis dirigida al sitio se obtuvo que la mayoría de los primers forward y reverse fueron marcados negativamente para la evaluación de los parámetros mencionados, por lo que es aceptable utilizar estos primers (Tabla 10). No obstante, al comparar los resultados entre OligoAnalyzer y OligoEvaluator™, se observa que el segundo programa predice la posible formación de autodímeros en los primers S121E-RQC y S121D-RQC. Sin embargo, se debe considerar la energía necesaria para la formación de estas estructuras secundarias, las cuales se ratifican con los valores de ΔG° obtenidos con el software OligoAnalyzer (**Pazdernik, 2012**).

Adicionalmente, en la Tabla 10 también se muestra los resultados obtenidos del número de abrazaderas GC (GC clamp) de los primers de las variantes mutantes *IsPETasa*. De manera general, todos los primers poseen valores positivos para GC clamp (mayor a cero), lo cual se encuentran dentro de los rangos establecidos por **PREMIER BIOSOFT, (2022)**, ya que se tolera un número GC clamp no mayor a 3 en las últimas 5 bases en el extremo 3' del primer.

Tabla 10. Análisis de estructuras secundarias de los primers de los métodos de mutagénesis dirigida al sitio.

<i>Método</i>	<i>Primer</i>	<i>Estructura Secundaria</i>	<i>Autodímero</i>	<i>GC clamp</i>
<i>QuikChange®</i>	S121E-FQC	Débil	No	2
	S121E-RQC	Débil	Sí	1
	S121D-FQC	Débil	No	2
	S121D-RQC	Débil	Sí	1
	D186H-FQC	Débil	No	2
	D186H-RQC	Débil	No	3
	R280A-FQC	Débil	No	0
	R280A-RQC	Débil	No	3
<i>Q5® Site-Directed Mutagenesis y Phusion Site-Directed Mutagenesis</i>	S121E-FQ5 y S121E-FPH	Débil	No	2
	S121E-RQ5 y S121E-RPH	Débil	No	1
	S121D-FQ5 y S121D-FPH	Débil	No	2
	S121D-RQ5 y S121D-RPH	Débil	No	1
	D186H-FQ5 y D186H-FPH	Débil	No	2
	D186H-RQ5 y D186H-RPH	Moderado	No	3
	R280A-FQ5 y R280A-FPH	Débil	No	0
	R280A-RQ5 y R280A-RPH	Moderado	No	2

Fuente: OligoEvaluator™, (2022).

Para la verificación de la especificidad de cada conjunto de primers de las variantes mutantes S121E, S121D, D186H y R280A de *IsPETasa* se ejecutó alineamientos con las secuencias de la variante silvestre WT y los primers forward y reverse de cada método de mutagénesis dirigida al sitio (Madeira et al., 2019). La Figura 12 y Figura 13 representan los alineamientos obtenidos por el método QuikChange®, en donde se puede evidenciar una alta especificidad (unión estable) entre las secuencias de los primers forward y reverse sobre la cadena bicatenaria de la

variante silvestre WT de *IsPETasa*. De acuerdo con un análisis minucioso de los alineamientos obtenidos, se comprobó que las posiciones iniciales dentro de la secuencia WT de los primers forward y reverse S121E, S121D, D186H y R280A corresponden a 349, 349, 544 y 826 nucleótidos respectivamente.

5' atgaacttccccctgcctcgcgccttatgcaggetgctgtgctggcgcccttatggcc 3' 60
3' tacttgaagggggcacggagcgcggaatacgtccgacgacacgaccgcggaataccgg 5' 60

5' gtttcgcgagcggccaccgcgcagaccaatccgtatgcgcgcccaccaaccctaccgcc 3' 120
3' caaaggcgctcgcgggtggcgcgtctggtaggcatacgcgcgccgggtgggatggcgg 5' 120

5' gcctcgttgaagccagcgcgggaccctttaccgttcgtagctttaccgtagccgtccg 3' 180
3' cggagcaaccttcggtcgcgccctgggaaatggcaagcatcgaatggcaatcggcaggc 5' 180

5' tccgatatggtgcagggaccgtctattaccaaccaatgcaggcggcaccggttgcgcg 3' 240
3' aggctataccacgtccctggcagataatgggttggttacgtccgcctggcaaccgcgc 5' 240

5' attgcaatcgtccccgggtacaccgcgcgtcaaagcagcattaagtgggggtccgcgc 3' 300
3' taacgtagcaggggccatgtggcgcgcagtttcgctcgtgaattcaccacccagcgcgc 5' 300

5' ttagctagccatggccttctgtgttattaccatcgatacgaacagcactctagaccagccc 3' 360
S121E-RQC 3' gatctggtcggg
S121E-FQC 5' ctgaccagccc
3' aatcgatcgggtaccgaaacaccaataatggtagctatgcttgctcgtgagatctggtcggg 5' 360

5' **agcagcgcgtagctcg**caacagatggccgcgcttcgtcaagttgcgagcttgaacgggacc 3' 420
ctttcggcatcgagc 5'
gaaagcgcgtagctcg 3'
3' **tcgtcggcatcgagc**gttgtctaccggcgcgaagcagttcaacgcctcgaacttgccttg 5' 420

5' agcagtagcccgatattacgaaaggctcgatactgcccgcatgggtgtgatgggctgtca 3' 480
3' tcgtcatcgggctaataatgcctttccagctatgacgggcgtaccacactaccgaccagt 5' 480

5' atggggggcggcggttcacttattagcgcgcgaacaacccgagtttaaagcagcggca 3' 540
3' taccocccgcgcccaagtgaataatcgcggcgcttgtgggctcaaatttctcgcgcgt 5' 540

5' ccgcagggcgccatgggactcttcaaccaac 3' 600
D186H-RQC 3' gtccgcgggtaccgtaagaagttggttg

D186H-FQC 5' cagggcgccatggcattcttcaaccaac 3'
3' ggcggtccgcgggtaccctgagaagttggttgaaagtcgtcacaatggcagcggctgcgactaa 5' 600

```

5' ttcgctgctgcgagaatgatagcattgcaccgggtgaacagcagcgcgctgccgatttatgat 3' 660
3' aagcgcaacgctcttactatcgtaacgtggccacttgcgctcgcgcgacggctaaatacta 5' 660

5' agcatgtcccgcaacgcaaaacagtttctggaaattaacggcggttagccactcttgtgcc 3' 720
3' tcgtacagggcggttgcggttttgcgtcaaaagaccttaattgcccgcctcgggtgagaacacgg 5' 720

5' aactctgggaacagcaaccaggcactgatcggaaaaaaggggttgcattgatgaaacga 3' 780
3' ttgagacccttgcgcttgggtccgtgactagccttttttccccaacgtacctactttgct 5' 780

5' ttcattgataatgacaccggttactcaaccttcgctgtgagaatcccaacagcacacgc 3' 840
R280A-RQC 3' gggttgctcgtgtggc
R280A-FQC 5' cccaacagcacaggc
3' aagtacctattactgtgggcaatgagttggaagcggacactcttagggttgctcgtgtgcg 5' 840

5' gtgtcggattttcgcaccgcaactgttcctcag 3' 876
cacagcctaaaa 5'

gtgtcggatttt 3'
3' cacagcctaaaaagcgtggcgcttgacaaggagctc 5' 876

```

Figura 12. Alineamiento de las secuencias de los primers forward y reverse de las variantes mutantes S121E, D186H y R280A con la variante silvestre WT de *IsPETasa* del método QuikChange®. Las mutaciones de las variantes contenidas en los primers se representan en color.

Fuente: Modificado de Madeira et al., (2019).

5' atgaacttcccccgctgcctcgcgcttatgcaggetgctgtgctgggcggccttatggcc 3' 60
3' tacttgaagggggcacggagcgcggaatacgtccgacgacacgacccgcggaataccgg 5' 60

5' gtttccgcagcggccaccgcgagaccaatccgatatgcgcgccgcccccaacctaccgcc 3' 120
3' caaaggcgctcgccggtggcgctctggtaggcatacgcgcgccgggttgatggcgg 5' 120

5' gcctcgttgaagccagcgggaccctttaccgctcgtagctttaccgtagccgtccg 3' 180
3' cggagcaaccttcggtcgcgcctgggaaatggcaagcatcgaatggcaatcggcaggc 5' 180

5' tccgatatggtgcagggaccgtctattaccaaccaatgcaggcggcaccggttgccgcg 3' 240
3' aggctataccacgtccctggcagataatgggttggttacgtccgcctggcaccgcgc 5' 240

5' attgcaatcgtccccgggtacaccgcgctcaaagcagcattaagtgggtggggtccgcgc 3' 300
3' taacgttagcaggggccccatgtggcgccagtttcgtcgtatcaccacccagcgcgc 5' 300

5' ttagctagccatggctttggttattaccatcgatacgaacagcactctagaccagccc 3' 360
S121D-RQC 3' gatctggtcggg
S121D-FQC 5' cttagaccagccc
3' aatcgatcgggtaccgaaacaccaataatggtagctatgcttgtcgtgagatctggtcggg 5' 360

5' **agcagcogtagctcg**caacagatggccgcgcttcgtcaagttgcgagcttgaacgggacc 3' 420
cttcggcatcgagc 5'
gatagccogtagctcg 3'
3' **tcgtcggcatcgagc**gttgtctaccggcggaagcagttcaacgctcgaacttgccctgg 5' 420

5' agcagtagccccgatattacggaaaggtcgatactgcccgatgggtgatgggctggtca 3' 480
3' tcgtcatcgggctaataatgcctttccagctatgacggcgtaccacactaccgaccagt 5' 480

5' atggggggcggcggttcaacttattagcgcgcgaacaaccgagtttaaagcagcggca 3' 540
3' tccccccgccgccaagtgaaataatcgcggcgcttgggtcgaatcttcgtcgcgct 5' 540

5' ccgcagggcgccatgggactccttcaaccaacttcagcagtggtaccgtgccgacgctgatt 3' 600
3' ggcgtccgcggtaccctgagaagtggtgaagtcgtcacaatggcacggctgcgactaa 5' 600

5' ttcgctgagcagaaatgatagcattgcaccggtgaacagcagcgcgctgccgatttatgat 3' 660
3' aagcgcagccttactatcgtaacgtggccacttgcgtcgcgcgagcggcctaatacta 5' 660

5' agcatgtcccgcaacgcgaacagtttctggaatataacggcggtagccactccttgctcc 3' 720
3' tcgtacagggcgttcggtttgtcaagaccttaattgcccgcacatcggtgagaacacgg 5' 720

5' aactctgggaacagcaaccaggcactgatcggaaaaaaggggttgcacgatgaaacga 3' 780
3' ttgagacccttgcgttggtccgtgactagcctttttttccccaacgtacctactttgct 5' 780

5' ttcacggataatgacacccggttactcaaccttcgcctgtgagaat**cccaacagcacacgc** 3' 840
3' aagtacctattactgtgggcaatgagttggaagcggacactccttagggttgctggtgctg 5' 840

5' gtgtcggatTTTTgcaccgcgaactgttcctcgag 3' 876
3' cacagcctaaaagcgtggcgcttgacaagggagctc 5' 876

Figura 13. Alineamiento de las secuencias de los primers forward y reverse de la variante mutante S121D con la variante silvestre WT de *IsPETasa* del método QuikChange®. La mutación de la variante contenida en el primer forward se representa en color.

Fuente: Modificado de Madeira et al., (2019).

En las Figuras 14, 15, 16 y 17 se muestran los alineamientos de los primers obtenidos por los métodos Q5® Site-Directed Mutagenesis y Phusion Site-Directed Mutagenesis (Madeira et al., 2019). Por ambos métodos también se evidenció una alta especificidad de los primers forward y reverse en la secuencia de la variante silvestre WT de *IsPETasa*.

Así mismo, se comprobó que los primers forward de cada variante mutante poseen las mismas posiciones a lo mencionado por el método QuikChange®, con la diferencia de que los extremos 5' de los primers por el método Phusion Site-Directed Mutagenesis se encuentran fosforilados. Las posiciones iniciales de los primers reverse de las variantes mutantes S121E, S121D, D186H y R280A corresponden a 322, 322, 517 y 789 nucleótidos respectivamente.

5' atgaacttcccccgctgcctcgcgccttatgcaggctgctgtgctggcgcccttatggcc 3' 60
3' tacttgaagggggcacggagcgcggaatacgtccgacgacacgaccccgccgaataccgg 5' 60

5' gtttccgcagcggccaccgcgcagaccaatccgtatgcgcgcggccccaaccctaccgcc 3' 120
3' caaaggcgtcgccggtggcgctctggttaggcatacgcgcgcggggttgggatggcgg 5' 120

5' gcctcgttgaagccagcgcgggaccctttaccggttcgtagctttaccgtttagccgtccg 3' 180
3' cggagcaaccttcggtcgcgccctgggaaatggcaagcatcgaaatggcaatcggcaggc 5' 180

5' tccggatatggtgcagggaccgtctattaccaaccaatgcagggcggcacccgttggcgcg 3' 240
3' aggcctataccacgtccctggcagataatggggttggttacgtccgccgtggcaaccgcgc 5' 240

5' attgcaatcgtccccgggtacaccgcgcgtcaaagcagcattaagtgggtggggtccgcgc 3' 300
3' taacgtagcaggggcccagtggtggcgcgcagtttcgctcgttaattcaccaccccagggcgcg 5' 300

5' ttagctagccatggctttgtg**gttattaccatcgatacgaacagcact**ctagaccagccc 3' 360
S121E-RQ5 3' caataatggtagctatgcttgcgtga

S121E-FQ5 5' ctagaccagccc
3' aatcgatcggtagccgaaacaccaataatggtagctatgcttgcgtgag**atctggtcggg** 5' 360

5' agcagccgtagctcgcacagatggccgcgcttcgtaagttgcgagcttgaacgggacc 3' 420

gaaagccgtagctcg 3'
3' **tcgtcggcatcgagc**gttgtctaccggcgcgaagcagttcaacgctcgaacttgcctgg 5' 420

5' agcagtagcccgatattacggaaaggtcgatactgcccgcatgggtgtgatgggctggtca 3' 480
3' tcgtcatcgggctaaatgcctttccagctatgacggcgtaccacactaccgaccagct 5' 480

5' atggggggcggcggttcaacttattagcgcgcgaa**caaccgagtttaaagcagcggca** 3' 540
D186H-RQ5 3' ttgggctcaaattttcgtcgcctg

3' taccctccgcccgaagtgaataatcgcggcgttgttgggctcaaattttcgtcgcctg 5' 540

5' **ccg**cagggcgcctatgggactcttcaaccaacttcagcagtggtaccgtgccgacgctgatt 3' 600
ggc 5'

D186H-FQ5 5' caggcgcctatgg**cat****tcttcaaccaac**
3' ggc**gtccgcggtagccctgagaagttggttga**agtcgtcacaatggcagcggctgcgactaa 5' 600

5' ttcgctgctgagagaatgatagcattgcaccggatgaacagcagcgcgctgccgatttatgat 3' 660
3' aagcgcacgctcttactatcgtaacgtggccacttgcgtcgcgcgacggctaaatacta 5' 660

5' agcatgtcccgcacgcaaaacagtttctggaatataacggcggtagccactcttgtgcc 3' 720
3' tcgtacagggcgttgcggtttgtcaaagaccttaattgccgcatcggtgagaacacgg 5' 720

5' aactctgggaacagcaaccaggcactgatcggaaaaaaggggttgcagtgatgaaacga 3' 780
3' ttgagacccttgcgttgggtccgtgactagccttttttccccaacgtacctactttgct 5' 780

5' ttcatggataatgacacc**cgttactcaaccttcgcctgtgagaat**cccaacagcacacgc 3' 840
R280A-RQ5 3' gcaatgagttggaagcggacactctta

R280A-FQ5 5' cccaacagcaca**gcg**
3' aagtacctattactgtgggcaatgagttggaagcggacactctta**gggttgctcgtgtgcg** 5' 840

5' gtgtcggatthttcgcaccgcgaactgttcacctcgag 3' 876

gtgtcggatthtt 3'
3' **cacagcctaaaa**gcgtggcgcttgacaagggagctc 5' 876

Figura 14. Alineamiento de las secuencias de los primers forward y reverse de las variantes mutantes S121E, D186H y R280A con la variante silvestre WT de *IsPETasa* del método Q5® Site-Directed Mutagenesis. Las mutaciones de las variantes contenidas en los primers forward se representan en color.

Fuente: Modificado de Madeira et al., (2019).

5' atgaacttccccctgacctcgccttatgcaggctgctgtgctggcgcccttatggcc 3' 60
3' tacttgaagggggcacggagcgcggaatacgtccgacgacacgacctccggaataaccgg 5' 60

5' gtttcgcgagcggccaccgcgcagaccaatccgtatgcgcgcgcccccaacctaccgcc 3' 120
3' caaaggcgtcgcgggtggcgcgctctggtaggcatacgcgcgccccgggtgggatggcgg 5' 120

5' gcctcgttgaagccagcgcgggacctttaccgttcgtagctttaccgtagccgtccg 3' 180
3' cggagcaaccttcggtcgcgcctgggaaatggcaagcatcgaatggcaatcggcaggc 5' 180

5' tccgatatggtgcagggacctctattaccaaccaatgcaggcggcaccgttggcgcg 3' 240
3' aggcctataccacgtccctggcagataatgggttggttacgtccgacctggcaaccgcgc 5' 240

5' attgcaatcgtccccgggtacaccgcgcgtcaaagcagcattaagtgggggtccgcgc 3' 300
3' taacgttagcaggggcccattgtggcgcgagtttcgtogtaattcaccacccagggcgcg 5' 300

5' ttagctagccatggctttgtg**gttattaccatcgatacgaacagcact**ctagaccagccc 3' 360
S121D-RQ5 3' caataatggtagctatgcttgcgtga

S121D-FQ5 5' ctagaccagccc
3' aatcgatcgggtaccgaaacaccaataatggtagctatgcttgcgtga**gatctggctggg** 5' 360

5' agcagccgtagctcgcaacagatggccgcgcttctgcaagttgagcttgaacgggacc 3' 420

3' **gatagccgtagctcg** 3'

3' **tcgtcggcatcgagc**gttgtctaccggcggaagcagttcaacgctcgaacttgccctgg 5' 420

5' agcagtagcccgatattacggaaaggtcgatactgcccgcatgggtgatgggctgggtca 3' 480

3' tcgtcatcgggctaataatgcctttccagctatgacggcggtacccacactacccgaccagt 5' 480

5' atggggggcgggcggttcacttattagcgccgcaacaacccgagtttaaagcagcggca 3' 540

3' taccctccgcccgaagtgaataatcgggcgcttgttgggctcaaattttcgtcgccgt 5' 540

5' ccgagggcgccatgggactcttcaaccaacttcagcagtgttaccgtgccgacgctgatt 3' 600

3' gggtccgcggtaccctgagaagttggttgaagtcgacacaatggcagggctgcgactaa 5' 600

5' ttcgctgagcagaatgatagcattgcaccggggaacagcagcgcgctgccgatttatgat 3' 660

3' aagcgcagcctcttactatcgtaacgtggccacttgcgctcgcgacggctaaatacta 5' 660

5' agcatgtcccgaacgcaaaacagtttctggaataaacggcggtagccactcttgtgcc 3' 720

3' tcgtacagggcggttgcggtttgtcgaagaccttaattgcccgcctcgggtgagaacacgg 5' 720

5' aactctgggaacagcaaccaggcactgatcggaaaaaaggggttgcagtgatgaaacga 3' 780

3' ttgagacccttgcggttgggtccgtgactagcctttttttcccaacgtacctactttgct 5' 780

5' ttcagtgataatgacacccggttactcaaccttcgcctgtgagaatcccaacagcacacgc 3' 840

3' aagtacctattactgtgggcaatgagttggaagcggacactcttagggttgcgctgtgcg 5' 840

5' gtgtcggattttcgcaccgcaactgttccctcgag 3' 876

3' cacagcctaaaagcgtggcgcttgacaagggagctc 5' 876

Figura 15. Alineamiento de las secuencias de los primers forward y reverse de las variantes mutantes S121D con la variante silvestre WT de *IsPETasa* del método Q5® Site-Directed Mutagenesis. La mutación de la variante contenida en el primer forward se representa en color.

Fuente: Modificado de Madeira et al., (2019).

Adicionalmente, de acuerdo con el análisis obtenido de los alineamientos de los primers de todos los métodos de mutagénesis dirigida al sitio, se corroboró que las mutaciones S121E, S121D, D186H y R280A contenidos en los primers forward se localizan a 361 – 363, 361 – 363, 556 – 558 y 838 – 840 nucleótidos respectivamente de la cadena complementaria de la variante silvestre WT de *IsPETasa*.

```

5' atgaacttcccccgctgacctcgcccttatgcaggctgctgtgctggcgcccttatggcc 3' 60
3' tacttgaagggggcacggagcgcggaatacgtccgacgacacgacccgcggaataccgg 5' 60

5' gtttcgcgagcggccaccgcgacagaccaatccgtatgcgcgcgccccaaccctaccgcc 3' 120
3' caaaggcgtcgccggtggcgcgctctggtaggcatacgcgcgccggggttgggatggcgg 5' 120

5' gcctcgttgaagccagcgcgggaccctttaccgttcgtagctttaccgtttagccgtccg 3' 180
3' cggagcaaccttcggtcgccctgggaaatggcaagcatcgaaatggcaatcggcaggc 5' 180

5' tccgatatggtgcagggaccgtctattaccaaccaatgcaggcggcaccggttggcgcg 3' 240
3' aggctataccacgtccctggcagataatggggttggttacgtccgctggcaaccgcgc 5' 240

5' attgcaatcgtccccgggtacaccgcgctcaaagcagcattaagtgggtgggtccgcgc 3' 300
3' taacgttagcaggggcccattgtggcgcgagtttcgctgtaattcaccaccccaggcgcg 5' 300

5' ttagctagccatggcttgggtggtattaccatcgatacgaacagcactctagaccagccc 3' 360
S121E-RPH 3' caataatggtagctatgcttgcgtga
S121E-FPH 5' P ctagaccagccc
3' aatcgatcgggtaccgaaacaccaataatggtagctatgcttgcgtgagatctggtcggg 5' 360

5' agcagccgtagctcgcaacagatggccgcgcttcgtcaagttgcgagcttgaacgggacc 3' 420
gaaagccgtagctcg 3'
3' tcgtcggcatcgagcgttgtctaccggcggaagcagttcaacgctcgaacttgccctgg 5' 420

5' agcagtagcccgatattacggaaaggtcgatactgcccgcagtggtgtgatgggctgggtca 3' 480
3' tcgtcatcgggctaataatgcctttccagctatgacggcgctacccacactaccgaccagt 5' 480

5' atggggggcgggcggttcacttattagcgcgcgaaacaaccgagtttaaagcagcggca 3' 540
D186H-RPH 3' ttgggctcaaattttcgctgcgcgt
3' taccctccgcccgaagtgaataatcgggcgcttgggtggctcaaattttcgctgcgcgt 5' 540

```

5' **ccg**caggcgccatgggactcttcaaccaacttcagcagtggtaccgtgccgacgetgatt 3' 600
ggc 5' P

D186H-FPH 5' P **caggcgccatgg****cat**tcttcaaccaac
3' ggc**gtccg****cggtaccctg**agaagttggtgaagtcgtcacaatggcacggctgcgactaa 5' 600

5' ttcgctgcgagaatgatagcattgcaccggtgaacagcagcgctgccgatttatgat 3' 660
3' aagcgcacgctcttactatcgtaacgtggccacttgcgtcgcgacggctaaatacta 5' 660

5' agcatgtcccgaacgcaaaacagtttctggaaattaacggcggtagccactcttgtgcc 3' 720
3' tcgtacagggcgttgcgttttgcataagacctttaattgccgccatcggtgagaacacgg 5' 720

5' aactctgggaacagcaaccaggcactgatcgaaaaaaggggttgcattgatgaaacga 3' 780
3' ttgagacccttgcgttggccgtagccttttttccccaacgtacctactttgct 5' 780

5' ttcattgataatgacacc**cgttactcaaccttcgcctgtgagaat**cccaacagcacacgc 3' 840
R280A-RPH 3' **gcaatgagttggaagcggacactctta**

R280A-FPH 5' P **cccaacagcac****g****cg**
3' aagtacctattactgtgggcaatgagttggaagcggacactctta**gggttgcgtgtgcg** 5' 840

5' gtgtcggatthttcgcaccgcgaactgttcctcgag 3' 876

gtgtcggatthtt 3'
3' **cacagcctaaaa**gctggtggcgttgacaagggagctc 5' 876

Figura 16. Alineamiento de las secuencias de los primers forward y reverse de las variantes mutantes S121E, D186H y R280A con la variante silvestre WT de *IsPETasa* del método Phusion Site-Directed Mutagenesis. Las mutaciones de las variantes contenidas en los primers forward se representan en color.

Fuente: Modificado de Madeira et al., (2019).


```

5' aactctgggaacagcaaccaggcactgatcggaaaaaaggggttgcacgatgaaacga 3' 780
3' ttgagacccttgctcgttggtccgtgactagcctttttttccccaacgtacctactttgct 5' 780

5' ttcacggataatgacacccggttactcaaccttcgcctgtgagaatcccaacagcacacgc 3' 840
3' aagtacctattactgtgggcaatgagttggaagcggacactccttagggttgctcgtgtgcg 5' 840

5' gtgtcggatTTTTcgcaaccggaactgttcctcag 3' 876
3' cacagcctaaaagcgtggcgcttgacaagggagctc 5' 876

```

Figura 17. Alineamiento de las secuencias de los primers forward y reverse de la variante mutante S121D con la variante silvestre WT de *IsPETasa* del método Phusion Site-Directed Mutagenesis. La mutación de la variante contenida en el primer forward se representa en color.

Fuente: Modificado de Madeira et al., (2019).

3.1.6. Validación del diseño de primers mediante PCR *in silico*

La evaluación del control de calidad y especificidad de los par de primers de las variantes mutantes S121E, S121D, D186H y R280A de *IsPETasa* se llevó a cabo mediante un ensayo de PCR *in silico*, utilizando el software Unipro UGENE (Okonechnikov et al., 2012). En la Tabla 11, se muestran los resultados teóricos de la PCR de los primers de las variantes mutantes por los métodos Q5® Site-Directed Mutagenesis y Phusion Site-Directed Mutagenesis. De cada par de primers se obtuvieron dos productos de PCR previstos (amplicones) cuyas temperaturas de annealing (Ta) recomendada oscilan en un rango de 64,18 – 64,70 °C, los cuales son valores óptimos para llevar a cabo la PCR mutagénica, ya que, según PREMIER BIOSOFT, (2022), los primers con Tm superiores a 70 °C tienen tendencia a una hibridación secundaria. Los amplicones obtenidos por los métodos mencionados también se pueden evidenciar en la sección de Anexos, en las Figuras 19 – 22.

Por otra parte, se obtuvieron amplicones con tamaños de 5548 y 6255 pb en los par de primers S121E-FQ5 – S121E-RQ5; S121D-FQ5 – S121D-RQ5; S121E-FPH – S121E-RPH y S121D-FPH – S121D-RPH, mientras que los cebadores D186H-FQ5 – D186H-RQ5 y D186H-FPH – D186H-RPH de 5743 y 6252 pb. Así mismo, los

primers R280A-FQ5 – R280A-RQ5 y R280A-FPH – R280A-RPH presentaron amplicones de 6025 y 6255 pb. De acuerdo con un análisis minucioso se evidencia que los productos de PCR *in silico* de los par de primers de las variantes mutantes de *IsPETasa* por los métodos Q5® Site-Directed Mutagenesis y Phusion Site-Directed Mutagenesis se encuentran en el rango del tamaño del plásmido de interés pET21b(+)-*Is-PETase* que corresponde a 6233 pb (Addgene, 2021), lo cual nos indica que se podría realizar la PCR mutagénica sin mayores inconvenientes. No obstante, los softwares de acceso libre no pueden amplificar los productos de PCR *in silico* de los par de primers obtenidos por el método QuikChange® debido a la forma en la que se diseñan estos cebadores que son complementarios entre sí (Agilent Technologies, 2021).

Adicionalmente, el programa Unipro UGENE no admite la simulación de PCR *in silico* con secuencias de ADN de plásmidos circulares, para lo cual se utilizó la secuencia del plásmido pET21b(+)-*Is-PETase* linealizado para amplificar los productos de los par de primers en direcciones de derecha a izquierda y de izquierda a derecha de los métodos Q5® Site-Directed Mutagenesis y Phusion Site-Directed Mutagenesis respectivamente (UniproUGENE, 2022).

Tabla 11. Resultados de la PCR *in silico* de los par de primers de las variantes mutantes *IsPETasa* de los métodos de mutagénesis dirigida al sitio.

<i>Método</i>	<i>Primer</i>	<i>Productos de PCR previstos</i>	<i>Tamaño del amplicón (pb)</i>	<i>Región del producto en la secuencia</i>	<i>Ta preferida (°C)</i>
<i>Q5® Site-Directed Mutagenesis</i>	S121E-FQ5	1	5548	1 – 5548	64,18
	S121E-RQ5	2	6255	1 – 6255	64,22
	S121D-FQ5	1	5548	1 – 5548	64,18
	S121D-RQ5	2	6255	1 – 6255	64,22
	D186H-FQ5	1	5743	1 – 5743	64,70
	D186H-RQ5	2	6252	1 – 6252	64,68
	R280A-FQ5	1	6025	1 – 6025	64,21
	R280A-RQ5	2	6255	1 – 6255	64,22
<i>Phusion Site-Directed Mutagenesis</i>	S121E-FPH	1	5548	1 – 5548	64,18
	S121E-RPH	2	6255	1 – 6255	64,22
	S121D-FPH	1	5548	1 – 5548	64,18
	S121D-RPH	2	6255	1 – 6255	64,22

D186H-FPH	1	5743	1 – 5743	64,70
D186H-RPH	2	6252	1 – 6252	64,68
R280A-FPH	1	6025	1 – 6025	64,21
R280A-RPH	2	6255	1 – 6255	64,22

Fuente: Okonechnikov et al., (2012).

3.1.7. Análisis del diseño de primers mediante los métodos de mutagénesis dirigida al sitio

La mutagénesis dirigida al sitio se fundamenta en la amplificación mediante PCR de dos primers que contienen las mutaciones de interés, para lo cual se emplea como molde el ADN plasmídico que se desea mutar y ADN polimerasas que son específicas para una PCR de alta fidelidad (Andreassen et al., 2019).

En el presente estudio, se eligió el diseño y validación *in silico* de primers para la construcción de las variantes mutantes S121E, S121D, D186H y R280A de *IsPETasa* mediante tres métodos de mutagénesis dirigida. Siguiendo la metodología descrita en el Capítulo II. Materiales y Métodos, se han obtenido 12 par de primers (24 primers) aplicando los métodos QuikChange®, Q5® Site-Directed Mutagenesis y Phusion Site-Directed Mutagenesis (Tabla 7), para llevar a cabo experimentos *in vitro* de mutagénesis dirigida al sitio mediante ensayos de PCR convencional en el laboratorio.

Durante el procedimiento del diseño de los primers se tomó en cuenta varios de los parámetros mencionados con anterioridad, para lo cual los primers propuestos cumplen con los criterios generales para el diseño de cebadores mediante mutagénesis como longitud, T_m y %GC, a excepción de 4 par de primers: S121E-FQ5 y S121E-RQ5; S121E-FPH y S121E-RPH; S121D-FQ5 y S121D-RQ5; S121D-FPH y S121D-RPH que poseen valores de ΔT_m mayor a 5 °C. Sin embargo, sería recomendable analizar el rendimiento de la reacción, así como la especificidad y sensibilidad de estos primers en ensayos de PCR *in vivo* antes de rechazar esta propuesta. De la misma manera, los resultados obtenidos para la predicción de la formación de posibles estructuras secundarias (horquillas, autodímeros y heterodímeros), también cumplen

con las recomendaciones mencionadas, por lo que los primers propuestos no representarían ningún problema durante la reacción de PCR.

El diseño de primers mediante los métodos de mutagénesis dirigida ha sido objeto de muchas investigaciones. Una de ellas, fue realizada por **Austin et al., (2018)**, en el que amplificaron el gen que codifica la *IsPETasa* con las mutaciones S238F/W159H y W185A utilizando el método Q5® Site-Directed Mutagenesis, obteniendo una secuencia de 927 pb. En este trabajo, las mutaciones mencionadas se introdujeron mediante mutagénesis dirigida, considerando que la doble mutante fue insertada en una segunda etapa, de esta manera se demostró que un conjunto de sutiles modificaciones en la secuencia de ADN de la *IsPETasa* hace a la enzima que tenga la capacidad de despolimerizar poliésteres aromáticos como el polietileno-2,5-furan dicarboxílico (PEF). Así mismo, en el estudio realizado por **Son et al., (2019)**, se probó que la variante mutante S121E/D186H/R280A aumenta significativamente la actividad enzimática de la *IsPETasa* hasta 14 veces frente al PET, para ello, la secuencia del gen fue amplificado por PCR mutagénica utilizando el diseño de primer mediante QuikChange®.

Por otra parte, la especificidad del diseño de los primers se llevó a cabo mediante alineamientos, para lo cual los cebadores diseñados poseen una alta especificidad para sus respectivos objetivos (Figuras 12 – 17). Así mismo, mediante un ensayo *in silico* de PCR se confirmó la especificidad de los primers, los cuales representan el producto de amplificación esperado (Tabla 11), ya que el gen de la *IsPETasa* se amplificó mediante PCR *in silico* utilizando como plantilla los primers diseñados por los métodos seleccionados de mutagénesis dirigida al sitio. Mediante este análisis, se podría recomendar los primers propuestos para reacciones por mutagénesis dirigida para experimentos *in vitro* e *in vivo* basados en PCR como los establecidos en los protocolos de cada kit comercial QuikChange®, Q5® Site-Directed Mutagenesis y Phusion Site-Directed Mutagenesis respectivamente.

No obstante, para valorar la eficiencia de los primers propuestos en este estudio, es necesario analizar la especificidad y sensibilidad de los cebadores mediante ensayos de PCR *in vivo*, con el objetivo de establecer los parámetros óptimos para

llevar a cabo los procesos de amplificación. Una vez ajustados dichas condiciones, esto permitiría la estandarización de los protocolos de PCR, sin embargo, suele ser un proceso demoroso y que genera costos elevados en reactivos, pero que a su vez evitaría impactos radicales y directos sobre los resultados de amplificación que se desarrollan por pequeños cambios de temperaturas o en los reactivos empleados.

Al comparar los primers diseñados por los diferentes métodos de mutagénesis dirigida, se puede establecer que los primers propuestos cumplen con los requerimientos citados, por lo que estos cebadores nos permitirían construir las variantes mutantes S121E, S121D, D186H y R280A de la enzima PETasa de *Ideonella sakaiensis*. Sin embargo, los primers obtenidos por el método QuikChange® representan los mejores resultados con relación a los cebadores de las técnicas Q5® Site-Directed Mutagenesis y Phusion Site-Directed Mutagenesis, debido a la facilidad y rapidez que presentan en las directrices del diseño de los primers.

Con base en este estudio, se propone un punto de partida para el empleo de los primers diseñados en investigaciones relacionados a la mutagénesis dirigida que permitan la modificación y la amplificación del gen de la enzima *IsPETasa* mediante la reacción de PCR con el fin de mejorar más su actividad enzimática, especificidad, estabilidad y capacidad de degradación contra el PET en condiciones normales y suaves dentro o fuera del laboratorio.

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

- Se ha diseñado y validado primers para la construcción de las variantes mutantes S121E, S121D, D186H y R280A de la enzima PETasa de *I. sakaiensis* por medio de métodos de mutagénesis dirigida al sitio, en donde se obtuvo como mejor método los primers diseñados por QuikChange®, debido a la facilidad y rapidez en las directrices de diseño de primers.
- Los métodos de mutagénesis dirigida identificados fueron QuikChange®, Q5® Site-Directed Mutagenesis y Phusion Site-Directed Mutagenesis, los cuales presentan ser ajustables y funcionales para la construcción del plásmido pET21b(+)-*Is*-PETase para la expresión de la enzima PETasa.
- Se ha diseñado 24 primers para la construcción de las variantes mutantes S121E, S121D, D186H y R280A de la enzima *Is*PETasa, que cumplen con los parámetros establecidos para el diseño de cebadores destinados a la amplificación por mutagénesis dirigida al sitio.
- Se validó los primers diseñados mediante herramientas bioinformáticas, en donde por medio de PCR *in silico* se obtuvo que, los pares de primers propuestos permitieron la correcta amplificación de las variantes mutantes S121E, S121D, D186H y R280A de la enzima *Is*PETasa.

4.2. Recomendaciones

- Se recomienda seguir todas las indicaciones propuestas en las directrices de diseño de primers de los métodos de mutagénesis dirigida al sitio.
- Si los valores de T_m de los primers diseñados son muy bajos, se recomienda localizar una secuencia con mayor contenido de GC o extender la longitud del primer.
- Emplear los softwares de diseño de primers en línea disponibles en cada kit comercial de los métodos de mutagénesis dirigida para la verificación de los resultados.
- Analizar el rendimiento de la reacción, así como la especificidad y sensibilidad de los primers propuestos en ensayos de PCR *in vivo*.
- Evaluar la eficiencia de los primers propuestos en este estudio mediante ensayos de PCR *in vivo*, con el objetivo de establecer los parámetros óptimos para llevar a cabo los procesos de amplificación.

BIBLIOGRAFÍA

5.1. Referencias bibliográficas

Acosta, A. P. (1999). *Aplicaciones biotecnológicas a la degradación de residuos plásticos*.

<https://www.upo.es/cms1/export/sites/upo/moleqla/documentos/Numero35/Destacado-2.pdf>

Addgene. (2021). *Addgene: página de inicio*. <https://www.addgene.org/>

Agilent Technologies. (2021). *QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit Instruction Manual*. www.genomics.agilent.com

Almeida, E. L., Rincón, A. F. C., Jackson, S. A., & Dobson, A. D. W. (2019). In silico Screening and Heterologous Expression of a Polyethylene Terephthalate Hydrolase (PETase)-Like Enzyme (SM14est) With Polycaprolactone (PCL)-Degrading Activity, From the Marine Sponge-Derived Strain *Streptomyces* sp. SM14. *Frontiers in Microbiology*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02187>

Andreassen, P. R., Pettersen, J. S., & Jørgensen, M. (2019). Site-Directed Mutagenesis for In Vitro and In Vivo Experiments Exemplified with RNA Interactions in *Escherichia Coli*. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, *144*. <https://doi.org/10.3791/58996>

Arvanitoyannis, S., Bosnea, L. A., & Arvanitoyannis, I. S. (2001). Food Reviews International RECYCLING OF POLYMERIC MATERIALS USED FOR FOOD PACKAGING: CURRENT STATUS AND PERSPECTIVES RECYCLING OF POLYMERIC MATERIALS USED FOR FOOD PACKAGING: CURRENT STATUS AND PERSPECTIVES. *FOOD REVIEWS INTERNATIONAL*, *17*(3), 291–346. <https://doi.org/10.1081/FRI-100104703>

Austin, H. P., Allen, M. D., Donohoe, B. S., Rorrer, N. A., Kearns, F. L., Silveira, R. L., Pollard, B. C., Dominick, G., Duman, R., Omari, K. El, Mykhaylyk, V., Wagner, A., Michener, W. E., Amore, A., Skaf, M. S., Crowley, M. F., Thorne, A. W., Johnson, C. W., Woodcock, H. L., ... Beckham, G. T. (2018). Characterization and engineering of a plastic-degrading aromatic polyesterase.

- Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(19), E4350–E4357.
<https://doi.org/10.1073/PNAS.1718804115>
- Bachman, J. (2013). Site-Directed Mutagenesis. *Methods in Enzymology*, 529, 241–248. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-418687-3.00019-7>
- Bench, B. T. (2019). *PCR Primer Design Tips*.
<https://www.thermofisher.com/blog/behindthebench/pcr-primer-design-tips/>
- Chen, C.-C., Han, X., Ko, T.-P., Liu, W., & Guo, R.-T. (2018). Structural studies reveal the molecular mechanism of PETase. *The FEBS Journal*, 285(20), 3717–3723. <https://doi.org/10.1111/FEBS.14612>
- Chen, C. C., Han, X., Li, X., Jiang, P., Niu, D., Ma, L., Liu, W., Li, S., Qu, Y., Hu, H., Min, J., Yang, Y., Zhang, L., Zeng, W., Huang, J. W., Dai, L., & Guo, R. T. (2021). General features to enhance enzymatic activity of poly(ethylene terephthalate) hydrolysis. *Nature Catalysis* 2021 4:5, 4(5), 425–430. <https://doi.org/10.1038/s41929-021-00616-y>
- Edelheit, O., Hanukoglu, A., & Hanukoglu, I. (2009). Simple and efficient site-directed mutagenesis using two single-primer reactions in parallel to generate mutants for protein structure-function studies. *BMC Biotechnology*, 9(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-9-61/FIGURES/3>
- Furukawa, M., Kawakami, N., Oda, K., & Miyamoto, K. (2018). Acceleration of Enzymatic Degradation of Poly(ethylene terephthalate) by Surface Coating with Anionic Surfactants. *ChemSusChem*, 11(23), 4018–4025. <https://doi.org/10.1002/cssc.201802096>
- GARCÍA GALINDO, A. A., & SÁNCHEZ WILMER, H. (2016). Estudio Del Efecto En Las Propiedades Mecánicas Del Concreto Simple Reforzado Con Fibras De Tereftalato De Polietileno (Pet) Y Polipropileno (Pp). *Psychology Applied to Work: An Introduction to Industrial and Organizational Psychology, Tenth Edition Paul*, 53(9), 1689–1699.
- Han, X., Liu, W., Huang, J.-W., Ma, J., Zheng, Y., Ko, T.-P., Xu, L., Cheng, Y.-S., Chen, C.-C., & Guo, R.-T. (2017). Structural insight into catalytic mechanism of PET hydrolase. *Nature Communications* 2017 8:1, 8(1), 1–6.

<https://doi.org/10.1038/s41467-017-02255-z>

- Hemsley, A., Arnheim, N., Toney, M. D., Cortopassi, G., & Galas, D. J. (1989). A simple method for site-directed mutagenesis using the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Research*, *17*(16), 6545. <https://doi.org/10.1093/NAR/17.16.6545>
- Hiraga, K., Taniguchi, I., Yoshida, S., Kimura, Y., & Oda, K. (2019). Biodegradation of waste PET. *EMBO Reports*, *20*(11), 1–5. <https://doi.org/10.15252/embr.201949365>
- Holland, B. J., & Hay, J. N. (2002). The thermal degradation of PET and analogous polyesters measured by thermal analysis–Fourier transform infrared spectroscopy. *Polymer*, *43*(6), 1835–1847. [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(01\)00775-3](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(01)00775-3)
- Joo, S., Cho, I. J., Seo, H., Son, H. F., Sagong, H. Y., Shin, T. J., Choi, S. Y., Lee, S. Y., & Kim, K. J. (2018). Structural insight into molecular mechanism of poly(ethylene terephthalate) degradation. *Nature Communications*, *9*(1), 382–382. <https://doi.org/10.1038/S41467-018-02881-1>
- Kawai, F., Kawabata, T., & Oda, M. (2019). Current knowledge on enzymatic PET degradation and its possible application to waste stream management and other fields. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *103*(11), 4253–4268. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09717-y>
- Knott, B. C., Erickson, E., Allen, M. D., Gado, J. E., Graham, R., Kearns, F. L., Pardo, I., Topuzlu, E., Anderson, J. J., Austin, H. P., Dominick, G., Johnson, C. W., Rorrer, N. A., Szostkiewicz, C. J., Copié, V., Payne, C. M., Woodcock, H. L., Donohoe, B. S., Beckham, G. T., & McGeehan, J. E. (2020). Characterization and engineering of a two-enzyme system for plastics depolymerization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *117*(41), 25476–25485. <https://doi.org/10.1073/PNAS.2006753117>
- Laible, M., & Boonrod, K. (2009). Homemade site directed mutagenesis of whole plasmids. *Journal of Visualized Experiments*, *27*. <https://doi.org/10.3791/1135>
- Li, Y., Song, D., Song, Y., Zhao, L., Wolkow, N., Tobias, J. W., Song, W., & Dunaief, J. L. (2015). Iron-induced local complement component 3 (C3) up-regulation via

non-canonical transforming growth factor (TGF)- β signaling in the retinal pigment epithelium. *Journal of Biological Chemistry*, 290(19), 11918–11934. <https://doi.org/10.1074/JBC.M115.645903>

Liu, B., He, L., Wang, L., Li, T., Li, C., Liu, H., Luo, Y., & Bao, R. (2018). Protein Crystallography and Site-Direct Mutagenesis Analysis of the Poly(ethylene terephthalate) Hydrolase PETase from *Ideonella sakaiensis*. *ChemBioChem*, 19(14), 1471–1475. <https://doi.org/10.1002/CBIC.201800097>

Liu, C., Shi, C., Zhu, S., Wei, R., & Yin, C. C. (2019). Structural and functional characterization of polyethylene terephthalate hydrolase from *Ideonella sakaiensis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 508(1), 289–294. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2018.11.148>

Liu, H., & Naismith, J. H. (2008). An efficient one-step site-directed deletion, insertion, single and multiple-site plasmid mutagenesis protocol. *BMC Biotechnology*, 8(1), 91. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-8-91/FIGURES/5>

Madeira, F., Park, Y. M., Lee, J., Buso, N., Gur, T., Madhusoodanan, N., Basutkar, P., Tivey, A. R. N., Potter, S. C., Finn, R. D., & Lopez, R. (2019). The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. *Nucleic Acids Research*, 47(W1), W636–W641. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKZ268>

Maity, W., Maity, S., Bera, S., & Roy, A. (2021). Emerging Roles of PETase and MHETase in the Biodegradation of Plastic Wastes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 193(8), 2699–2716. <https://doi.org/10.1007/S12010-021-03562-4>

Maloy, S., Stewart, V., & Taylor, R. (2002). *Codon usage in E. coli*. <http://www.sci.sdsu.edu/~smaloy/MicrobialGenetics/topics/in-vitro-genetics/codon-usage.html>

Moog, D., Schmitt, J., Senger, J., Zarzycki, J., Rexer, K. H., Linne, U., Erb, T., & Maier, U. G. (2019). Using a marine microalga as a chassis for polyethylene terephthalate (PET) degradation. *Microbial Cell Factories*, 18(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1220-z>

New England Biolabs. (2021). *INSTRUCTION MANUAL Q5* ® *Site-Directed*

Mutagenesis Kit (Without Competent Cells).

- Okonechnikov, K., Golosova, O., Fursov, M., Varlamov, A., Vaskin, Y., Efremov, I., German Grehov, O. G., Kandrov, D., Rasputin, K., Syabro, M., & Tleukenov, T. (2012). Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics*, 28(8), 1166–1167. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTS091>
- OligoAnalyzer. (2021). *OligoAnalyzer Tool - primer analysis | IDT*. <https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer?returnurl=%2Fcalc%2Falyzer>
- OligoEvaluator™. (2022). *OligoEvaluator™ - Análisis de secuencias*. <http://www.oligoevaluator.com/LoginServlet>
- Owczarzy, R., Tataurov, A. V., Wu, Y., Manthey, J. A., McQuisten, K. A., Almabrazi, H. G., Pedersen, K. F., Lin, Y., Garretson, J., McEntaggart, N. O., Sailor, C. A., Dawson, R. B., & Peek, A. S. (2008). IDT SciTools: a suite for analysis and design of nucleic acid oligomers. *Nucleic Acids Research*, 36(Web Server issue), W163. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKN198>
- Palm, G. J., Reisky, L., Böttcher, D., Müller, H., Michels, E. A. P., Walczak, M. C., Berndt, L., Weiss, M. S., Bornscheuer, U. T., & Weber, G. (2019). Structure of the plastic-degrading *Ideonella sakaiensis* MHETase bound to a substrate. *Nature Communications*, 10(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09326-3>
- Pazdernik, N. (2012). *Determining the physical characteristics of your oligos*. <https://www.idtdna.com/pages/education/decoded/article/using-the-oligoanalyzer-program>
- Pérez, J. (2020). Biodegradation of polyethylene terephthalate: microorganisms, enzymes and future prospects. *Universidad de La Laguna*, 1(1), 1–30. [https://riull.ull.es/xmlui/bitstream/handle/915/20671/Biodegradacion de tereftalato de polietileno microorganismos, enzimas y perspectivas futuras.pdf?sequence=1](https://riull.ull.es/xmlui/bitstream/handle/915/20671/Biodegradacion%20de%20tereftalato%20de%20polietileno%20microorganismos,%20enzimas%20y%20perspectivas%20futuras.pdf?sequence=1)
- Pirzadeh, E., Zadhoush, A., & Haghghat, M. (2007). Hydrolytic and thermal degradation of PET fibers and PET granule: The effects of crystallization, temperature, and humidity. *Journal of Applied Polymer Science*, 106(3), 1544–

1549. <https://doi.org/10.1002/APP.26788>

PREMIER BIOSOFT. (2022). *Guía de diseño de cebadores para PCR :: Aprenda a diseñar cebadores para PCR.*

http://www.premierbiosoft.com/tech_notes/PCR_Primer_Design.html

Primrosa. (1982). Principles of Gene Manipulation. In *Journal of Medical Genetics* (Vol. 19, Issue 5). <http://jmg.bmj.com/cgi/doi/10.1136/jmg.19.5.397-a>

Sabel, J. (2012). *Métodos para la mutagénesis dirigida al sitio / IDT*. Integrated DNA Technologies.

<https://www.idtdna.com/pages/education/decoded/article/methods-for-site-directed-mutagenesis>

Sánchez, J. C. (2021). Construcción de los plásmidos pIN-PETasa, pET-PETasa, pGLAam7- PETasa para la expresión de la PETasa de *Ideonella sakaiensis* en *Escherichia coli* y *Aspergillus niger*, para la degradación de PET (politereftalato de etileno). *CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL UNIDAD ZACATENCO*. <https://repositorio.cinvestav.mx/bitstream/handle/cinvestav/2564/SSIT0016357.pdf?sequence=1>

Seo, H., Kim, S., Son, H. F., Sagong, H. Y., Joo, S., & Kim, K. J. (2019). Production of extracellular PETase from *Ideonella sakaiensis* using sec-dependent signal peptides in *E. coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 508(1), 250–255. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.11.087>

Sievers, F., & Higgins, D. G. (2018). Clustal Omega for making accurate alignments of many protein sequences. *Protein Science*, 27(1), 135–145. <https://doi.org/10.1002/PRO.3290>

Singh, V. K., & Kumar, A. (2001). Primer Design 27. *Molecular Biology Today*, 2(2), 27–32. www.caister.com/bacteria-plant

Son, H. F., Cho, I. J., Joo, S., Seo, H., Sagong, H. Y., Choi, S. Y., Lee, S. Y., & Kim, K. J. (2019). Rational Protein Engineering of Thermo-Stable PETase from *Ideonella sakaiensis* for Highly Efficient PET Degradation [Research-article]. *ACS Catalysis*, 9(4), 3519–3526. <https://doi.org/10.1021/acscatal.9b00568>

- Son, H. F., Joo, S., Seo, H., Sagong, H. Y., Lee, S. H., Hong, H., & Kim, K. J. (2020). Structural bioinformatics-based protein engineering of thermo-stable PETase from *Ideonella sakaiensis*. *Enzyme and Microbial Technology*, 141. <https://doi.org/10.1016/J.ENZMICTEC.2020.109656>
- ThermoScientific. (2021). *Phusion Site-Directed Mutagenesis Kit User Guide (Pub.No. MAN0013377 E.0)*.
- UniProt. (2021). *ISF6_4831 - Precursor de poli (tereftalato de etileno) hidrolasa - Ideonella sakaiensis (cepa NBRC 110686 / TISTR 2288/201-F6) - ISF6_4831 gen y proteína*. <https://www.uniprot.org/uniprot/A0A0K8P6T7>
- UniproUGENE. (2022). *In Silico PCR - Unipro UGENE User Manual - WIKI*. <https://doc.ugene.net/wiki/pages/viewpage.action?pageId=65930776&from=ugene>
- Wayne, D. (2021). *ApE: un editor de plásmidos*. <https://jorgensen.biology.utah.edu/wayned/ape/>
- Westburg. (2021). *Kit de mutagénesis dirigida al sitio Phusion* ›Westburg. <https://www.westburg.eu/products/genomics-research/cloning/site-directed-mutagenesis/phusion-site-directed-mutagenesis-kit>
- Widyastuti, G. (2018). Genetic Engineered *Ideonella Sakaiensis* Bacteria: A Solution of the Legendary Plastic Waste Problem. *SSRN Electronic Journal*, April. <https://doi.org/10.2139/ssrn.3194556>
- Yoshida, S., Hiraga, K., Takehana, T., Taniguchi, I., Yamaji, H., Maeda, Y., Toyohara, K., Miyamoto, K., Kimura, Y., & Oda, K. (2016). A bacterium that degrades and assimilates poly(ethylene terephthalate). *Science*, 351(6278), 1196–1199. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAD6359>
- Zhang, B. Z., Zhang, X., An, X. P., Ran, D. L., Zhou, Y. Sen, Lu, J., & Tong, Y. G. (2009). An easy-to-use site-directed mutagenesis method with a designed restriction site for convenient and reliable mutant screening. *Journal of Zhejiang University. Science. B*, 10(6), 479. <https://doi.org/10.1631/JZUS.B0820367>
- Zhang, K., Yin, X., Shi, K., Zhang, S., Wang, J., Zhao, S., Deng, H., Zhang, C., Wu,

Z., Li, Y., Zhou, X., & Deng, W. (2021). A high-efficiency method for site-directed mutagenesis of large plasmids based on large DNA fragment amplification and recombinational ligation. *Scientific Reports* 2021 11:1, 11(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-89884-z>

Zhu, L. (1996). In Vitro Site-Directed Mutagenesis Using the Unique Restriction Site Elimination (USE) Method. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 57, 13–29. <https://doi.org/10.1385/0-89603-332-5:13>

5.2 Anexos

CODON USAGE IN *E. COLI* GENES¹

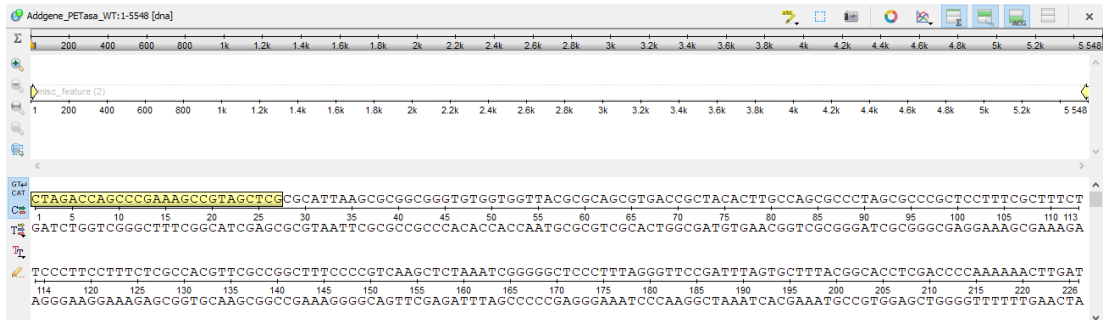
	Codon	Amino acid ²	% ³	Ratio ⁴	Codon	Amino acid	%	Ratio	Codon	Amino acid	%	Ratio	Codon	Amino acid	%	Ratio
U	UUU	Phe (F)	1.9	0.51	UCU	Ser (S)	1.1	0.19	UAU	Tyr (Y)	1.6	0.53	UGU	Cys (C)	0.4	0.43
	UUC	Phe (F)	1.8	0.49	UCC	Ser (S)	1.0	0.17	UAC	Tyr (Y)	1.4	0.47	UGC	Cys (C)	0.6	0.57
	UUA	Leu (L)	1.0	0.11	UCA	Ser (S)	0.7	0.12	UAA	STOP	0.2	0.62	UGA	STOP	0.1	0.30
	UUG	Leu (L)	1.1	0.11	UCG	Ser (S)	0.8	0.13	UAG	STOP	0.03	0.09	UGG	Trp (W)	1.4	1.00
C	CUU	Leu (L)	1.0	0.10	CCU	Pro (P)	0.7	0.16	CAU	His (H)	1.2	0.52	CGU	Arg (R)	2.4	0.42
	CUC	Leu (L)	0.9	0.10	CCC	Pro (P)	0.4	0.10	CAC	His (H)	1.1	0.48	CGC	Arg (R)	2.2	0.37
	CUA	Leu (L)	0.3	0.03	CCA	Pro (P)	0.8	0.20	CAA	Gln (Q)	1.3	0.31	CGA	Arg (R)	0.3	0.05
	CUG	Leu (L)	5.2	0.55	CCG	Pro (P)	2.4	0.55	CAG	Gln (Q)	2.9	0.69	CGG	Arg (R)	0.5	0.08
A	AUU	Ile (I)	2.7	0.47	ACU	Thu (T)	1.2	0.21	AAU	Asn (N)	1.6	0.39	AGU	Ser (S)	0.7	0.13
	AUC	Ile (I)	2.7	0.46	ACC	Thu (T)	2.4	0.43	AAC	Asn (N)	2.6	0.61	AGC	Ser (S)	1.5	0.27
	AUA	Ile (I)	0.4	0.07	ACA	Thu (T)	0.1	0.30	AAA	Lys (K)	3.8	0.76	AGA	Arg (R)	0.2	0.04
	AUG	Met (M)	2.6	1.00	ACG	Thu (T)	1.3	0.23	AAG	Lys (K)	1.2	0.24	AGG	Arg (R)	0.2	0.03
G	GUU	Val (V)	2.0	0.29	GCU	Ala (A)	1.8	0.19	GAU	Asp (D)	3.3	0.59	GGU	Gly (G)	2.8	0.38
	GUC	Val (V)	1.4	0.20	GCC	Ala (A)	2.3	0.25	GAC	Asp (D)	2.3	0.41	GGC	Gly (G)	3.0	0.40
	GUA	Val (V)	1.2	0.17	GCA	Ala (A)	2.1	0.22	GAA	Glu (E)	4.4	0.70	GGA	Gly (G)	0.7	0.09
	GUG	Val (V)	2.4	0.34	GCG	Ala (A)	3.2	0.34	GAG	Glu (E)	1.9	0.30	GGG	Gly (G)	0.9	0.13

- The data shown in this table is from the Arabidopsis Research Companion on the World Wide Web (<http://weeds/mgh.harvard.edu>). Codon frequencies for many other bacteria can be found at <http://morgan.angis.su.oz.au/Angis/Tables.html>.
- The letter in parenthesis represents the one-letter code for the amino acid.
- % represents the average frequency this codon is used per 100 codons.
- Ratio represents the abundance of that codon relative to all of the codons for that particular amino acid.

Figura 18. Tabla de uso de codones en *E. coli*.

Fuente: Maloy et al., (2002).

(A)



(B)

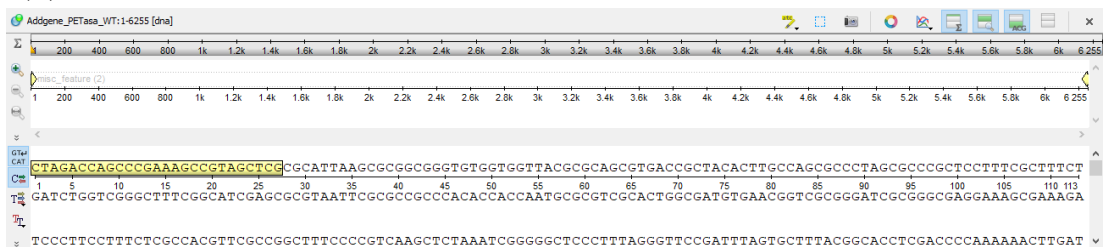


Figura 19. Resultados de la PCR *in silico* de los primers de la variante mutante S121E de *IsPETasa* obtenidos por los métodos Q5® Site-Directed Mutagenesis y Phusion Site-Directed Mutagenesis: (A) Amplicón previsto N°01; (B) Amplicón previsto N°02. Los primers forward y reverse se encuentran representados en las partes superiores por flechas amarillas.

Fuente: Okonechnikov et al., (2012).

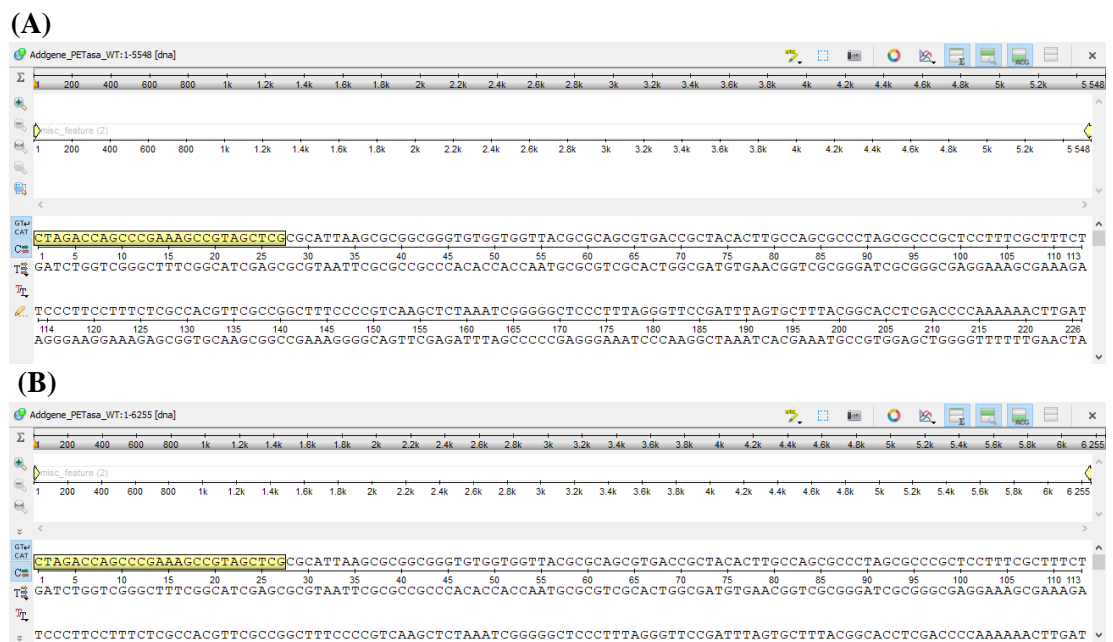


Figura 20. Resultados de la PCR *in silico* de los primers de la variante mutante S121D de *IsPETasa* obtenidos por los métodos Q5® Site-Directed Mutagenesis y Phusion Site-Directed Mutagenesis: (A) Amplicón previsto N°01; (B) Amplicón previsto N°02. Los primers forward y reverse se encuentran representados en las partes superiores por flechas amarillas.

Fuente: Okonechnikov et al., (2012).



Figura 21. Resultados de la PCR *in silico* de los primers de la variante mutante D186H de *IsPETasa* obtenidos por los métodos Q5® Site-Directed Mutagenesis y Phusion Site-Directed Mutagenesis: (A) Amplicón previsto N°01; (B) Amplicón previsto N°02. Los primers forward y reverse se encuentran representados en las partes superiores por flechas amarillas.

Fuente: Okonechnikov et al., (2012).



Figura 22. Resultados de la PCR *in silico* de los primers de la variante mutante R280A de *IsPETasa* obtenidos por los métodos Q5® Site-Directed Mutagenesis y Phusion Site-Directed Mutagenesis: (A) Amplicón previsto N°01; (B) Amplicón previsto N°02. Los primers forward y reverse se encuentran representados en las partes superiores por flechas amarillas.

Fuente: Okonechnikov et al., (2012).