



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A. C.**

DIVISIÓN DE BIOLOGÍA MOLECULAR

“Expresión heteróloga de la ATPasa TAA43 y la
alcohol deshidrogenasa Ta1316 procedentes de
Thermoplasma acidophilum”

Tesis que presenta

Erika Nahomy Marino Marmolejo

Para obtener el grado de

Doctora en Ciencias en Biología Molecular

Director de Tesis:

Dra. Leticia Santos

Co-Director de Tesis:

Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa

San Luis Potosí, S. L. P., Febrero 2009



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis "Expresión heteróloga de la ATPasa TAA43 y la alcohol deshidrogenasa Ta1316 procedentes de *Thermoplasma acidophilum*" presentada para obtener el Grado de Doctora en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Erika Nahomy Marino Marmolejo** y aprobada el **28 de 01 de 2009** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dra. Martha Leticia Santos Martínez
(Director de tesis)

Dr. Rubén H. López Revilla
(Presidente)

Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa
(Codirector de tesis)

Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro
(Secretario)

Dr. Antonio Rodríguez de León
(Asesor de tesis)

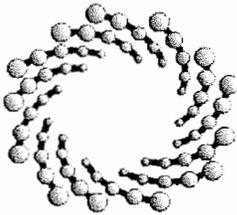
Dra. María del Carmen González Castillo
(Vocal)



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Biotecnología Molecular de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección de la Dra. Leticia Santos y co-dirección de la Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (no. de registro 182072) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.



IPICYT

Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 021 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Doctorado en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 19 días del mes de febrero del año 2009, se reunió a las 09:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Rubén López Revilla	Presidente	IPICYT
Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro	Secretaria	IPICYT
Dra. Ana Paulina Barba De la Rosa	Sinodal	IPICYT
Dr. Antonio De León Rodríguez	Sinodal	IPICYT
Dra. Ma. del Carmen González Castillo	Sinodal externo	UASLP
Dra. Martha Leticia Santos Martínez	Sinodal	IPICYT

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó la C.

Erika Nahomy Marino Marmolejo

sobre la Tesis intitulada:

Expresión heteróloga del ATPasa TAA43 y la alcohol deshidrogenasa Ta1316 procedentes de Thermoplasma acidophilum

que se desarrolló bajo la dirección de

Dra. Ana Paulina Barba De la Rosa
Dra. Martha Leticia Santos Martínez

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 10:40 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 19 días del mes de febrero de 2009.

Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento de Asuntos Escolares



Dedicatorias

A mi Familia por su apoyo y su cariño.

A mis Padres por todo su apoyo y amor brindado, en especial a mi Madre por su apoyo incondicional en todos los proyectos de mi vida y por alentarme a seguir adelante.

A mi hermana Nallely por su confianza.

A mis hermosos sobrinos que han llenado de alegría mi vida.

A Gustavo por su apoyo incondicional y ser parte de mi vida.

A mis amigos, gracias por brindarme su amistad incondicional y por su apoyo en las buenas y en las malas.

Agradecimientos

A la Dra. Leticia Santos, por su apoyo, paciencia y enseñanzas.

A la Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa, por su apoyo y asesoría.

Al Dr. Antonio de León Rodríguez por su asesoría.

A los Dres. Rubén López Revilla, Irene Castaño Navarro y Carmen González Castillo, por sus comentarios y tiempo invertido en la revisión de este trabajo de tesis.

Al M. en B. Leandro Gabriel Ordóñez por sus consejos técnicos.

A mis compañeros del Laboratorio de Biotecnología Molecular por su amistad y apoyo.

Al IPICYT por el apoyo para continuar mis estudios.

Al CONACYT por la beca de doctorado (182072)

Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	iii
Créditos institucionales	iv
Acta de examen	v
Dedicatorias	vi
Agradecimientos	vii
I. Introducción general	x
II. “Análisis estructural de la ATPasa TAA43 de <i>Thermoplasma acidophilum</i> ”	1
Resumen	2
Abstract	3
1. Introducción	4
1.1 Reino Archaea	4
1.2 <i>Thermoplasma acidophilum</i>	5
1.3 Cristalización	9
1.4 Sitting drop	12
2. Materiales y métodos	16
2.1 Clonación del gen Ta1175	16
2.2 Plásmido de expresión	17
2.2.1 Digestión con enzimas de restricción y fosforilación	17
2.2.2 Ligación	17
2.2.3 Transformación	18
2.2.4 Minipreparaciones	18
2.3 Expresión	19
2.4 Purificación	19
2.4.2 Cromatografía de afinidad	19
2.5 Cuantificación de proteína	20
2.6 Actividad ATPásica	20
2.7 Ensayos de cristalización	20
3. Resultados y discusión	22
3.1 Amplificación y clonación en el vector de expresión	22
3.2 Expresión de la proteína recombinante TAA43	23
3.3 Determinación de actividad ATPásica	25
3.4 Cristalización de TAA43	26
3.5 Características de TAA43	26
3.6 Ensayos de cristalización de TAA43	27
3.5 Difracción preliminar	31
4. Avances	34
5. Perspectivas	34
6. Referencias	35
III. “Producción heteróloga y caracterización de la alcohol deshidrogenasa Ta1316 proveniente de <i>Thermoplasma acidophilum</i> ”	39

Resumen	40
Abstract	41
1. Introducción	42
1.1 Enzimas extremofilas (Termozimas)	42
1.2 Alcohol deshidrogenasas (ADH)	43
1.3 Clasificación de las ADHs	44
1.4 Características de estructura de las ADH-NAD(P) dependientes	45
1.5 Aplicaciones biotecnológicas de las ADHs	45
2. Materiales y métodos	48
2.1 Obtención de los genes Ta0841 y Ta1316	48
2.2 Plásmido de expresión	49
2.2.1 Clonación de <i>Ta0841</i> y <i>Ta1316</i>	49
2.2.2 Transformación	50
2.2.3 Minipreparaciones	50
2.3 Expresión	50
2.4 Análisis por electroforesis	51
2.5 Western Blot	52
2.6 Zimogramas	52
2.7 Purificación	53
2.7.1 Cromatografía de afinidad	53
2.7.2 Cromatografía de filtración en gel	53
2.8 Ensayos de actividad	54
2.8.1 Determinación de temperatura, pH óptimos y termoestabilidad	54
3. Resultados y discusión	55
3.1 Análisis de secuencia	55
3.2 Clonación y expresión de Ta0841 y Ta1316	57
3.3 Expresión de las proteínas recombinantes	58
3.4 Purificación	59
3.5 Análisis por electroforesis	60
3.6 Western blot	61
3.7 Zimogramas de ADH	62
3.8 Caracterización enzimática	62
Publicación	69
4. Conclusiones	76
5. Perspectivas	77
6. Referencias	78
IV. Anexos	83

I

INTRODUCCIÓN GENERAL

El reino *Archaea* constituye uno de los tres dominios en los que se clasifican los seres vivos. Son microorganismos unicelulares carentes de núcleo y organelos. Fueron descubiertas hace 40 años en ambientes con condiciones extremas y desde entonces se les ha encontrado en todo tipo de hábitats. Debido a que varias especies de arqueas son microorganismos extremófilos poseen propiedades inusuales, lo que los convierte en una valiosa fuente de moléculas útiles en procesos biotecnológicos. Además el patrimonio genético de las arqueas es único ya que poseen genes ortólogos en bacterias y eucariontes, aunado a esto su información genética esta contenida dentro de un solo cromosoma circular pequeño ($0.49 \times 10^6 - 5 \times 10^6$ pares de bases). Todas estas características hacen a las moléculas de los microorganismos del reino *Archaea* modelos de estudio contra organismos más complejos, además de contribuir (biomasa y biocatalizadores) en el mejoramiento y desarrollo de procesos biotecnológicos.

Thermoplasma acidophilum es un microorganismo termo-acidofílico del que actualmente se cuenta con su información genética derivada de la secuenciación de su genoma. En este trabajo se realizó la expresión heteróloga de proteínas provenientes de *Thermoplasma acidophilum*: 1) la

ATPasa TAA43 de la familia de proteínas AAA y 2) las proteínas Ta0841 y Ta1316 ADH que presentan identidad con alcohol deshidrogenasas descritas en las bases de datos existentes.

En el caso de la proteína recombinante TAA43 se logró la obtención de condiciones idóneas de cristalización para la elucidación de su estructura tridimensional. Por último, se llevó a cabo la caracterización bioquímica de la alcohol deshidrogenasa Ta1316 ADH, la cual por sus características de termo-resistencia se propone como un candidato en los procesos de biocatálisis enzimática.

El presente trabajo de tesis esta organizado de la siguiente manera:

- I. Introducción general
- II. Análisis estructural de la ATPasa TAA43 de *Thermoplasma acidophilum*.
- III. Producción heteróloga y caracterización de la alcohol deshidrogenasa Ta1316 proveniente de *Thermoplasma acidophilum*.
- IV. Anexos

II

“Análisis estructural de la ATPasa TAA43 de
Thermoplasma acidophilum”

Resumen

Las proteínas AAA (**A**T**P**asas **A**sociadas con varias **A**ctividades celulares) son enzimas que se encuentran presentes en todos los reinos de vida (arqueas, bacterias y eucariontes) y están involucradas en importantes funciones celulares como son la proteólisis y el desdoblamiento/plegamiento de proteínas para mantener la homeostasis. *Taa43* es un *ORF* (por sus siglas en inglés, Open Reading Frame) presente en el genoma de *Thermoplasma acidophilum* cuyo gen codifica una proteína de 43 kDa (TAA43) y contiene un dominio AAA. TAA43 se clasifica como miembro de la familia AAA. Aún se desconoce su función por lo que la determinación de su estructura tridimensional ayudaría a esclarecer su participación en procesos celulares. Con el objetivo de realizar ensayos de cristalización en este trabajo, se expresó la ATPasa TAA43 en *Escherichia coli* con un rendimiento de 25 mg/l de proteína, un grado de pureza del 98% y actividad ATPásica. Se logró identificar las condiciones en las que crecen cristales de TAA43 y se confirmó la composición proteínica de los cristales de manera preliminar por difracción de rayos X.

Abstract

The AAA proteins (ATPases Associated with various cellular Activities) are enzymes found in all kingdoms of life (*Archaea*, *Bacteria* and *Eukarya*) and they are involved in important cellular functions such as proteolysis and unfolding/folding events to maintain homeostasis. The ORF (Open Reading Frame) *Taa43* from *Thermoplasma acidophilum* genome encodes a 43 kDa protein (TAA43) and contains one AAA domain. TAA43 is classified as a member of the AAA protein family. It remains to be clarified the real function of this protein and the three-dimensional structure would help to clarify its contribution in cellular processes. In this work, the AAA TAA43 protein was expressed in *Escherichia coli* in an amount of 25 mg/l, a purity of 98% and ATPase activity, with the ultimate purpose of carrying on crystalization assays. We were able to identify growth of crystals conditions for TAA43 and the composition confirmed these preliminary results by X-ray diffraction.

1. Introducción

1.1 Reino *Archaea*

Existen tres dominios en los que se clasifican los seres vivos: *Archaea*, *Bacteria* y *Eukarya*. Dentro del dominio de vida *Archaea*, se encuentran organismos que colonizan ambientes extremos, estos organismos poseen propiedades biológicas inusuales debido a la capacidad de vivir en dichos hábitats. Entre ellos están incluidos hipertermófilos, termófilos, termófilos con metabolismo sulfuroso, halófilos extremos y metanogénicos (Woese, 1977). El hecho de que las arqueas puedan habitar en condiciones extremas, y de que son muy abundantes en los océanos, ha llevado a proponer teorías de que estos organismos fueron los primeros habitantes del planeta (Stetter, 1996). Los microorganismos extremófilos se conocen desde hace 40 años, sin embargo, la búsqueda y estudio se ha intensificado en las últimas tres décadas por dos razones principales. La primera se basa en que el rango de condiciones bajo las cuales la vida puede existir rebasa la barrera previamente impuesta y esto ha originado la exploración de hábitats inhóspitos tanto naturales como los creados por el hombre. La segunda se debe a que los atributos de organismos adaptados a estos ambientes, e.g. biomasa o enzimas,

tienen un alto potencial para servir como plataforma para propósitos industriales (Schiraldi *et al.*, 2002). Por otro lado, las enzimas extremófilas pueden servir como sistemas modelo para ser utilizados por biólogos, químicos y físicos interesados en entender los procesos evolutivos, los mecanismos moleculares en la estabilidad proteínica y los límites de temperatura en las cuales las proteínas funcionan. Este conocimiento puede llevar al desarrollo de nuevas y más eficientes estrategias en ingeniería de proteínas para futuras aplicaciones biotecnológicas.

1.2 *Thermoplasma acidophilum*

Thermoplasma acidophilum es un organismo termo-acidofílico perteneciente al reino *Archaea*, fue aislado por primera vez en pilas de desechos de carbón (Darland *et al.*, 1970). Su hábitat primario son los campos sulfurosos (Seegerer *et al.*, 1985) y las condiciones óptimas de crecimiento son 59°C y pH de 1.5-2.0. Son células esféricas polimórficas con un diámetro entre 0.3 a 2 µm, sin organelas ni núcleo definido, tienen un pH interno de 5.5 (Hsung y Haug, 1975). Tiene un cromosoma circular, su genoma es relativamente pequeño de 1.5 millones de pares de bases. Debido a su simplicidad es un excelente modelo para estudiar proteínas de interés biológico para comparar su contraparte en organismos superiores.

El genoma de *T. acidophilum* ha sido secuenciado dando un total de 1,509 marcos de lectura (Ruepp *et al.*, 2000), en el que 55% de estos son similares a proteínas ya conocidas; un ejemplo de esto es el grupo perteneciente a la superfamilia de las ATPasas (familia AAA, *ATPase associated to several*

activities, por sus siglas en inglés). Estas proteínas están asociadas a diversas actividades celulares incluyendo proteólisis, plegamiento de proteínas, tráfico de membrana, regulación de citoesqueleto (microtúbulos), biogénesis de organelos, replicación de DNA y motilidad intracelular. Las ATPasas AAA se encuentran presentes en Eucariontes, Procariontes y Arqueas lo que revela la existencia de un ancestro común y que juegan un papel central en todas las formas de vida.

Las ATPasas juegan un papel importante en la conversión de energía almacenada químicamente, energía que es necesaria para las actividades biológicas, a través de la hidrólisis de ATP. La familia de las proteínas AAA guardan semejanza en su estructura, constan de tres dominios: uno de unión a fosfatos denominado Walker A (GXXXXGK[TS]), el segundo llamado Walker B de unión a iones metálicos (DEXX), además de una región característica denominada segunda región de homología (SRH), lo que las distingue de otras familias de ATPasas (Peters *et al.*, 1990). A estos dominios en conjunto se les conoce como *cassette* AAA (Figura 1). Las proteínas pertenecientes a esta familia contienen una o dos copias de este *cassette* y de acuerdo a esta característica la familia se subdividió en: tipo I (un solo *cassette*) y tipo II (dos *cassettes*). Por estudios estructurales se ha determinado que en su mayoría forman anillos homo-hexa o heptaméricos (Figura 2).

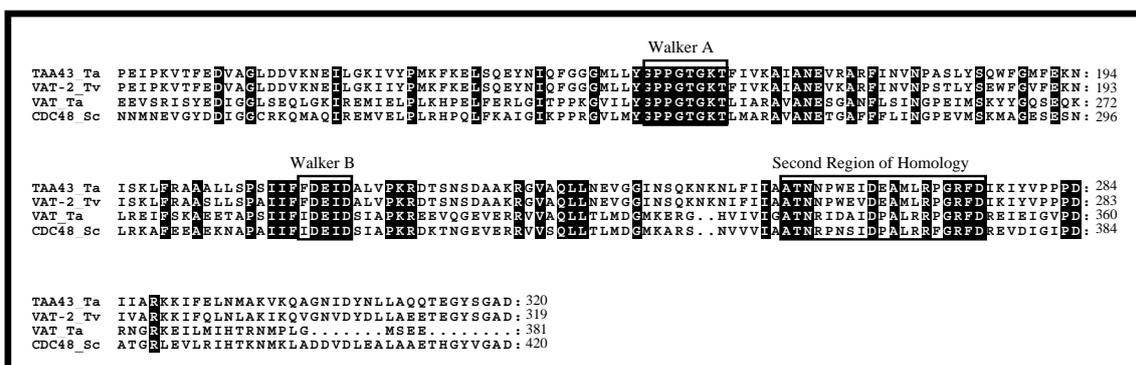


Figura 1. Alineamiento de TAA43 con otras ATPasas AAA, resaltando los dominios conservados y representativos de estas. (Santos, 2002)

En *T. acidophilum* se identificaron 4 genes que muestran características similares a las ATPasas AAA convencionales. La ATPasa TAA43 (*T. acidophilum* ATPasa de 43 kDa) es una de ellas y se clasificó como un nuevo miembro de la familia de las AAA (Santos *et al.*, 2004). El marco de lectura de la proteína denominado Ta1175, consta de 1128 pb y codifica una proteína homodimérica de 375 aminoácidos con un peso molecular de 43 kDa por unidad monomérica.

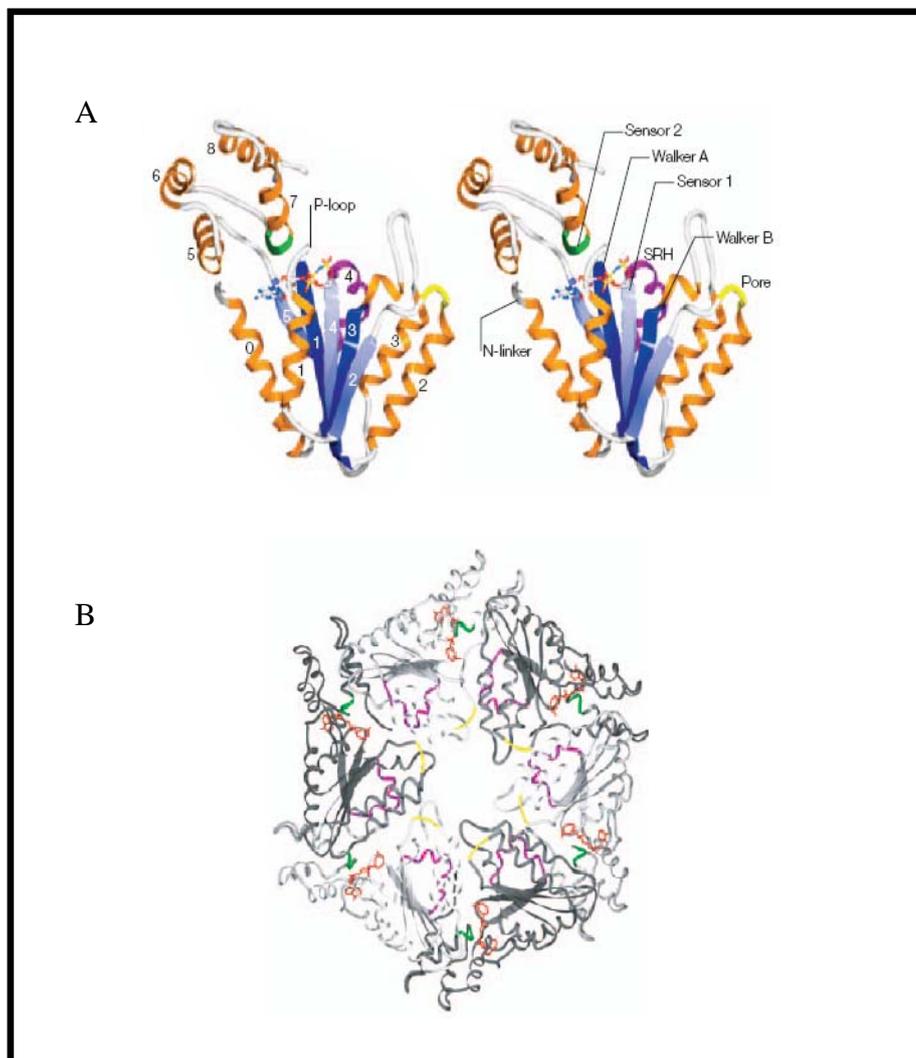


Figura 2. Estructura de ATPasas AAA. A) Representación de los dominios característicos de NSF (Hanson y Whiteheart, 2005). B) Anillo hexamérico, estructura de la ATPasa AAA p97. (Ogura y Wilkinson, 2001)

La TAA43 contiene una copia del *cassette* AAA clasificándose dentro del grupo de proteínas AAA tipo I. Análisis filogenéticos permitieron clasificar a TAA43 en la subfamilia meiosis/mitocondria de las ATPasas AAA (Santos *et al.*, 2004). A pesar de los estudios de caracterización bioquímica, no se sabe con exactitud la función de TAA43, aunque se propone una posible participación en la disociación de proteínas *de novo* (recien sintetizadas) no-ribosomales que se encuentran asociadas a ribosomas en los eventos previos o posteriores a la síntesis o bien durante su exportación (Santos y Zwickl, 2005). La característica estructural de la TAA43 es la formación de homodímeros; tal conformación es inusual para las ATPasas AAA, ya que como se mencionó estas tienden a ensamblar anillos hexaméricos. Estudios estructurales revelan que la formación de complejos oligoméricos de las ATPasas AAA, es crucial para los mecanismos de acción y la actividad ATPásica (Ogura y Wilkinson, 2001).

La estructura tridimensional de varias ATPasas de diferente origen han sido ya determinadas, por ejemplo HslU (Bochtler *et al.*, 2000), p97 (Zhang *et al.*, 2000), Cdc6 (Liu *et al.*, 2000), RuvB (Yamada *et al.*, 2001), NSF (Lenzen *et al.*, 1998), entre otras. Estas estructuras nos revelan características comunes entre ellas: presencia de dos dominios, el dominio N-terminal con un plegamiento α/β y un *pocket* de unión a nucleótidos (ATP), y un dominio α -hélice en la región C-terminal. A pesar de estas similitudes dentro de la misma familia de proteínas AAA se pueden distinguir diferencias en estructura y mecanismos moleculares (Ogura y Wilkinson, 2001).

El estudio cristalográfico de TAA43 para la determinación de su estructura tridimensional ayudaría, como en muchos otros casos, a conocer la función

común y a dilucidar la relación evolutiva con otras ATPasas AAA, así como conocer su participación en diversos procesos celulares de los organismos en los que están presentes.

1.3 Cristalización

La cristalografía de proteínas es el método más indicado para describir una molécula de proteína, ya que permite establecer la posición de cada uno de sus átomos, posibilitando determinar la relación entre estructura y función biológica de la proteína. Para lograr la cristalización de una proteína, esta debe experimentar una precipitación lenta en una solución acuosa. Esta formación cristalina se mantiene unida gracias a interacciones no covalentes.

La importancia de obtener estos cristales de proteínas, radica en que es la base para la cristalografía por rayos X medio por el cual se obtiene la estructura tridimensional. Los pioneros en el uso de la cristalografía por rayos X para determinar las estructuras tridimensionales de las proteínas fueron Max Perutz y John Kendrew en la década de los 50's.

La formación de cristales útiles para la difracción por rayos X, depende de diversos factores como la pureza y concentración de la proteína, pH, temperatura, presencia de precipitantes y iones metálicos en la solución, por lo que cada proteína requiere condiciones específicas para lograr una cristalización exitosa.

Los procesos de transporte, particularmente el transporte de masa, son muy importantes en el crecimiento de cristales a partir de soluciones acuosas (Benneman, 1974; Sarig, 1994). De hecho, los procesos de transporte de masa

y calor son críticos para la calidad y características de los cristales. Muchas técnicas de cristalogénesis han sido desarrolladas explícitamente para controlar las contribuciones relativas del transporte convectivo y difusivo en el crecimiento de cristales (Sarig, 1994). Durante la incorporación activa de iones o moléculas a la red se generan diferencias de densidad en la proximidad de las caras en crecimiento y surge el flujo convectivo en el entorno inmediato al cristal en crecimiento, hay que considerar que este tipo de transporte de masa ocurre solamente en presencia de gravedad. Solo así los fluidos pesados bajarán y los fluidos ligeros subirán, surgiendo las corrientes necesarias en el seno de la solución. Existen otros tipos de convección, como la producida por la tensión superficial (Rosenberger, 1986) pero esta no es significativa en la cristalización en solución. Los fenómenos de transporte no solo afectan a los componentes sino también a la velocidad de adsorción e incorporación de impurezas. Estas últimas alteran el tamaño, el desarrollo morfológico y la perfección del cristal (McPherson, 1999).

El proceso de cristalización de una macromolécula biológica implica llevar a cabo la disminución de la solubilidad de esta, a una velocidad lenta y constante y un tiempo adecuado. Dos aspectos esenciales de la cristalización de proteínas son: **a)** los termodinámicos relacionados con la solubilidad de la proteína y **b)** los cinéticos, relacionados con el control de la nucleación y el crecimiento de cristales (Figura 3). Al cristalizar una proteína, debemos tener claro que la curva de equilibrio esta relacionada con aspectos de solubilidad. Debajo de esta curva se encuentra la zona de subsaturación (A), arriba de la curva tenemos la zona de metaestabilidad, en esta zona ocurre el crecimiento cristalino, más arriba tenemos la zona de nucleación (B) en la que crecen los

núcleos que formaran los cristales (Jenkins, 1998). En otras palabras una vez que el sistema esta en el punto A, se necesita un método (difusión) que permita viajar a la región de nucleación punto B y una vez formados los núcleos necesarios el sistema vuelva al equilibrio pasando por la región de metaestabilidad (punto C) en donde los núcleos cristalinos puedan crecer hasta alcanzar el tamaño adecuado de un cristal (mm).

El crecimiento de un cristal de proteínas necesita un proceso previo: la formación de un núcleo capaz de crecer. El núcleo es un conjunto de partículas estructurales dispuestas ordenadamente que puede servir de “semilla” que dé origen al crecimiento del futuro cristal. Existen dos tipos de nucleación la homogénea que se origina de partículas que se unen entre sí por fluctuaciones estadísticas; y la nucleación heterogénea, es menos común y se forma a partir de la asociación de una partícula de impureza o en una superficie que actúa como centro de nucleación. Para la existencia del núcleo se necesita una supersaturación crítica, dada por la muestra y los agentes precipitantes presentes en el medio (McPherson, 1999).

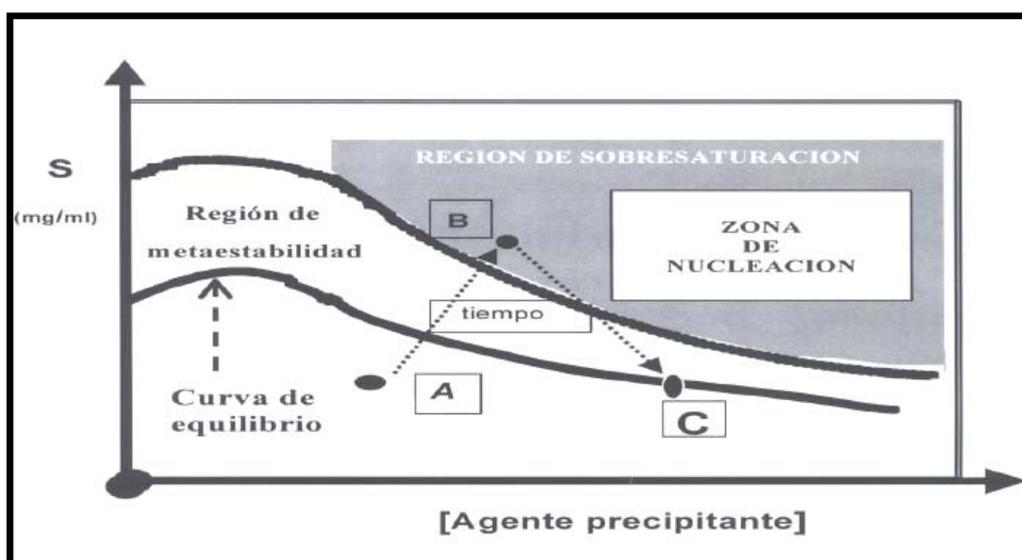


Figura 3. Diagrama de solubilidad de Oswald-Miers para proteínas. Zona de subsaturación (A), región de supersaturación (B). Finalmente se tiende al equilibrio donde aumenta la solubilidad de las biomoléculas (C). (Jenkins, 1998)

1.4 Sitting-drop (difusión en vapor)

Existen diversos procedimientos para llevar a cabo la cristalización proteínica, uno de los más usados es el que se basa en la difusión de vapor que utiliza la evaporación y difusión del agua entre soluciones de diferentes concentraciones para lograr la sobresaturación de las moléculas de proteína. La diferencia de concentración entre la solución de la gota que contiene la proteína y la solución del reservorio es la fuerza motriz que hace que el agua se evapore, desde la gota al reservorio (Figura 4A) hasta que se alcance un equilibrio y la concentración de la solución de la gota sea igual a la solución del reservorio (Figura 4B), debido a esto la proteína se concentra. Los primeros cristales aparecen cuando la concentración de proteína aumenta, entonces el cristal crece hasta que la concentración de la proteína llega a un estado de solubilidad.

La técnica de difusión de vapor llamada *sitting-drop*, se basa en la colocación de una gota sobre una superficie, es ideal para el análisis de un amplio espectro de condiciones de cristalización y puede ser escalado para la obtención de cristales apropiados para el análisis de difracción. La gota está compuesta de la muestra (proteína pura) y del reactivo líquido (precipitante, iones metálicos, buffers con diferentes pH) se coloca en un reservorio con mayor cantidad del reactivo que en la gota, para que en esta se logre el equilibrio (McPherson, 1999).

Moléculas de sal están presentes como aditivos en las soluciones de cristalización para precipitar, por lo que frecuentemente se forman cristales que

son difíciles de diferenciar de los cristales de proteína. Una vez que los cristales se han obtenido se deben de realizar pruebas a fin de demostrar si son cristales de proteínas o salinos. La difracción por rayos X es la prueba más convincente para determinar la naturaleza de los cristales, además de que proporciona datos sobre la estructura de la proteína.

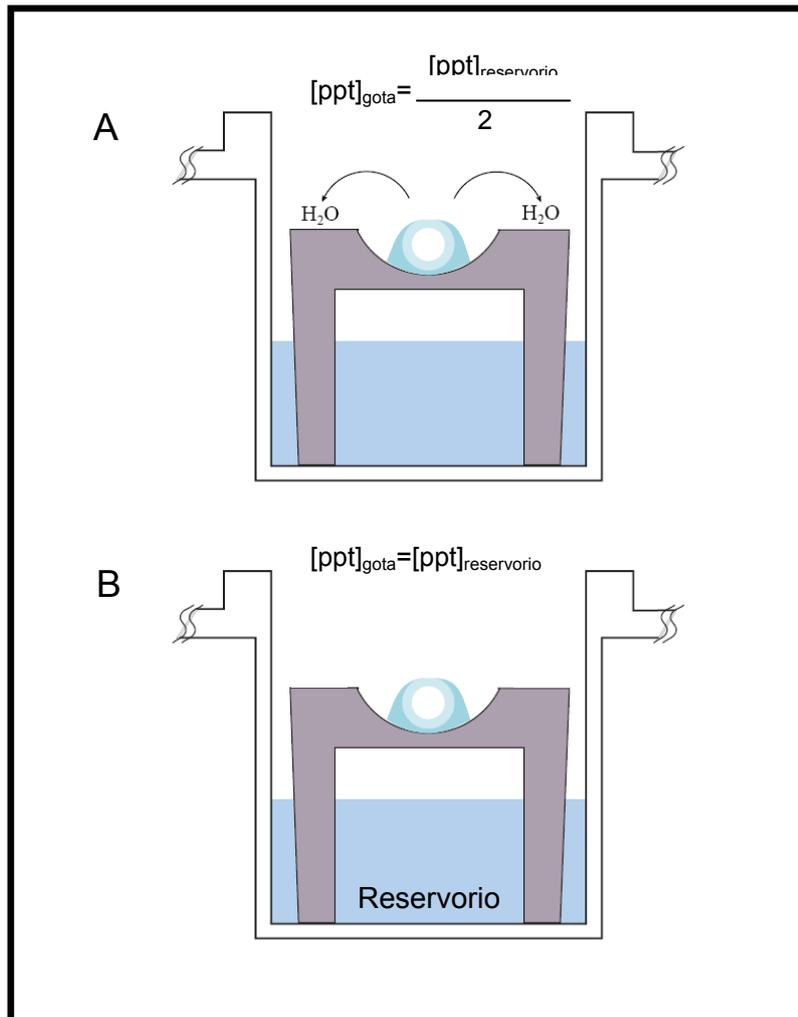


Figura 4. Esquema de cristalización por el método de *sitting-drop* (ppt: iones precipitantes).

Los rayos X son radiaciones electromagnéticas con una longitud de onda de 10^{-10} m (Angstrom), suficiente para resolver los átomos del cristal. Los rayos X que más interesan en el campo de la cristalografía son aquellos con una longitud de onda próxima a 1 Angstrom y corresponden a una frecuencia de

aproximadamente 3×10^6 THz (tera-hertzios) y a una energía 12.4 keV (kilo-electrón-volts), a su vez equivaldrían a una temperatura de aproximadamente 144 millones de grados Celsius, este tipo de rayos X (denominados rayos X duros) se producen en un sincrotrón. Un sincrotrón esta compuesto por un anillo grande (el orden de km) con canales por los que se hace circular a altas velocidades a los electrones, con ayuda de campos magnéticos de gran energía se induce a los electrones a cambiar de dirección y es en ese momento cuando emiten la radiación sincrotrónica, que esta compuesta por un continuo de longitudes de onda que van desde las microondas hasta los rayos X duros.

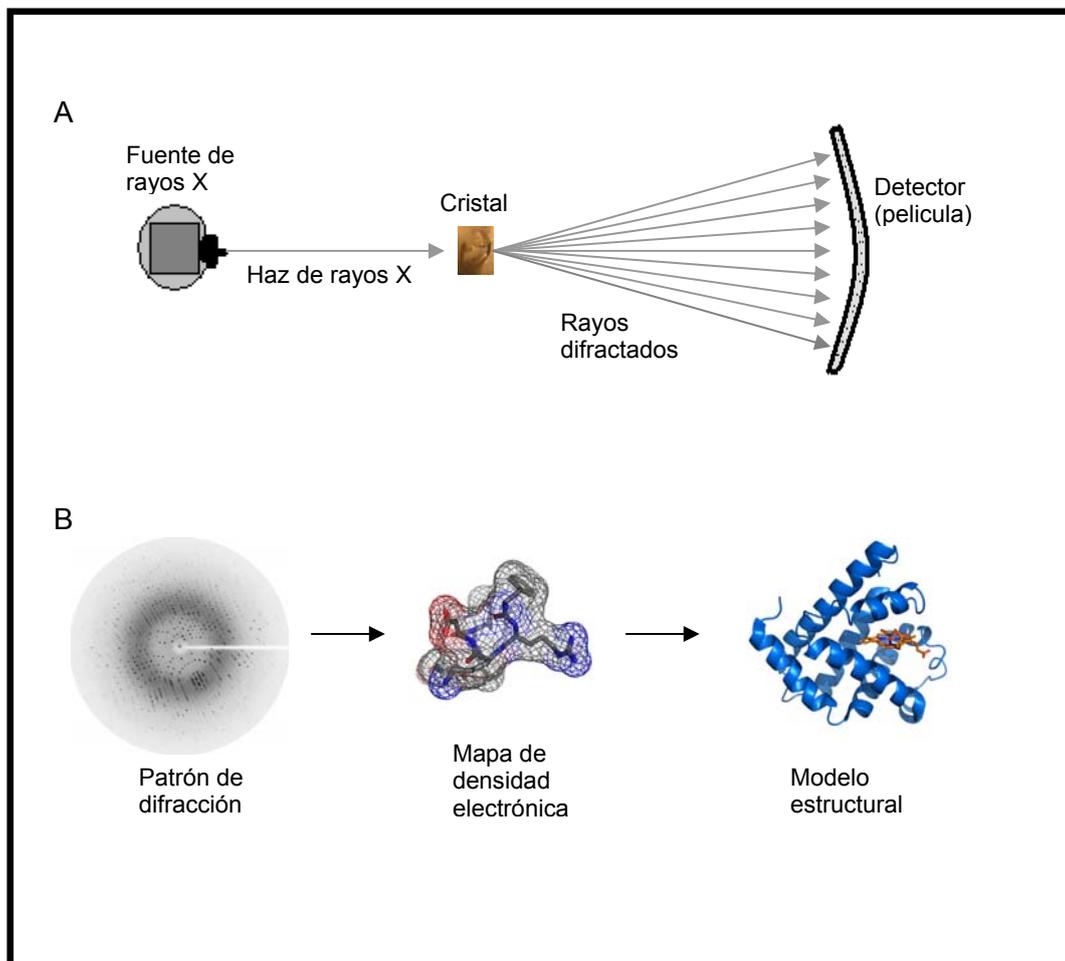


Figura 5. Fases de la cristalografía de rayos X. A) Obtención del patrón de difracción. B) Modelamiento de la estructura tridimensional a partir del patrón de difracción.

La interacción de los átomos con los rayos-X, dispersan los rayos con la producción de un patrón de interferencia, conocido como patrón de difracción, la magnitud de esta desviación depende de la densidad electrónica que encuentren a su paso. La intensidad de las ondas difractadas se registra en una película radiográfica o con un detector de estado sólido. En la película se observan manchas discretas, creando un patrón complejo, ya que de una proteína pequeña se pueden obtener hasta 25,000 manchas de difracción, por ende es necesario realizar cálculos complejos para interpretar el patrón de difracción y descifrar la estructura (Figura 5).

Gracias a programas de computadora especializados (Mosfilm y CCP4), es posible medir los patrones de difracción para determinar la distribución espacial de los átomos dentro de los cristales. La interpretación química de esto proporciona un modelo atómico que revela la estructura tridimensional de las moléculas de proteína contenidas dentro del cristal.

2. Materiales y Métodos

2.1 Clonación del gen Ta1175 (TAA43)

El ADN genómico de *Thermoplasma acidophilum* fue donado por el Departamento de Bioquímica del Instituto Max Planck de Alemania, extraído con el protocolo propuesto por Ruepp et al. (2000). El gen Ta1175 se amplificó por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En base a la secuencias del gen de la base de datos (no. de acceso NP394631) se utilizó un par de oligonucleótidos específicos para amplificar el gen completo. Dichos oligonucleótidos se diseñaron con el fin de adicionar a la secuencia amplificada dos sitios de corte para las enzimas de restricción *NcoI* y *XhoI* en los extremos 5' y 3' respectivamente: sentido 5'-CATGCCATGGGCGTGTTGGATGACATCGACGAGAAG-3'; antisentido 5'-CGAAATACAGGGAATTCGCTGGATTCCTCGAGCGG-3'. Para la PCR, la mezcla de reacción se realizó manteniéndola a 4°C. Para cada reacción se utilizó 78 ng de ADN genómico de *T. acidophilum*, 0.2 µM de cada oligonucleotido, 0.02 mM de dNTP's mix (Invitrogen), 2 mM de MgCl₂, 1 U de polimerasa de alta fidelidad *Tli* (Promega) y buffer PCR 1X en un volumen final de 50 µL. El programa de amplificación se programó en un termociclador (BioRad) con un calentamiento inicial a 94°C durante 4 minutos, seguido por 25 ciclos de 94°C por un minuto, 57°C por un minuto y 72°C por un minuto, seguido por una extensión final a 72°C durante 10 minutos. Los productos de la amplificación se limpiaron utilizando el *kit* de limpieza para productos de PCR (Invitrogen, Anexo 1). Posteriormente se sometieron a una extensión con *Taq*

polimerasa para agregar los extremos poliA en las secuencias adicionando PCR buffer 1X, 2 mM MgCl₂, 1 mM dNTP's mix y 1 U de *Taq* Polimerasa (Invitrogen). Los productos de la amplificación se analizaron en geles de agarosa al 1% (Anexo 2).

2.2 Plásmido de expresión

Para la clonación del gen Ta1175 amplificado se utilizó el plásmido de expresión pET28a+ (Invitrogen). Este plásmido tiene como característica el adicionar secuencias de Histidinas en los extremos terminales al momento de clonar el gen de interés.

2.2.1 Digestión con enzimas de restricción y des-fosforilación

La digestión del vector y el producto de PCR se realizaron por separado con 1 µg del vector y de 10 µg del inserto amplificado. Se adicionó 1 U de cada una de las enzimas (*Nco*I y *Xho*I, Invitrogen) y buffer de reacción 1X final, en un volumen total de 20 µl. La reacción se incubó en un termomixer a 37°C durante 1 hora y 30 minutos. Para evitar religación del plásmido se realizó la des-fosforilación de los extremos digeridos del vector (pET28a+) con 1 U de fosfatasa alcalina de camarón (SAP, USB), incubando a 37°C durante 1 hora, subsecuentemente se inactivó la enzima a 65°C durante 15 minutos.

2.2.2 Ligación

La ligación se realizó en un volumen total de 20 µL con 1 U de ligasa T4 (Promega), buffer de ligación rápida (Promega) 1X final y 1:3 de la relación

vector:inserto. La reacción se incubó en termomixer a 17°C por un periodo de 12 horas. El producto de ligación se analizó en gel de agarosa al 1.2%.

2.2.3 Transformación

Se prepararon células competentes de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS por el método de cloruro de rubidio (Anexo 3). A cada vial de 100 µL de células competentes se les agregó 20 µL del producto de la ligación y se incubó 30 minutos en hielo, posteriormente se incubó a 42°C por 45 segundos y se colocó en hielo durante 1 minuto. Después de este procedimiento las células se suspendieron en 300 µL de medio líquido LB (Anexo 4) y se incubaron a 37°C en agitación constante durante 1 hora. Las células se plaquearon en cajas con LB agar con antibiótico de selección (Anexo 4) y se incubaron durante toda la noche a 37°C. Se seleccionaron colonias y se cultivaron en 3 mL de medio líquido LB más antibiótico (Anexo 4).

2.2.4 Minipreparaciones (kit Qiaprep, Qiagen)

Se recuperaron las células de los 3 mL de cultivo por centrifugación y la pastilla celular se resuspendió de acuerdo a las instrucciones del *kit* (Anexo 5). La mezcla se centrifugó para descartar los restos celulares y el sobrenadante se colocó en la columna del kit se agregó buffer de unión y se centrifugó. Se adicionó 750 µL de buffer de lavado y se centrifugó. Por último se recuperó el DNA plasmídico de la columna por elución con agua estéril. La construcción se verificó por análisis de restricción con las enzimas *NcoI* y *XhoI*, para la liberación del inserto. Las construcciones que contienen el fragmento de

tamaño esperado (1100 pb) se enviaron a secuenciar para asegurar la fidelidad de las secuencias.

De las clonas positivas se hicieron respaldos en glicerol al 15% y se almacenaron a -70°C, para el trabajo posterior con estas.

2.3 Expresión

De las clonas generadas se seleccionó una verificada por secuenciación de ADN, y se realizó la expresión de la proteína recombinante TAA43. Los ensayos de expresión se llevaron a cabo en 50 ml de medio LB para determinar las condiciones de temperatura y tiempo óptimo de incubación después de la inducción con IPTG. Para ese propósito se preparó un preinóculo a partir de la clona positiva en 25 mL de medio LB con antibióticos (Anexo 4) y se incubó durante 12 horas a 37°C. Se calculó la cantidad de preinóculo necesaria para iniciar el cultivo con una densidad óptica (OD) de 0.2 (600 nm) en 1 L de medio LB y se incubó a 37°C, hasta que la OD alcanzó un valor de 0.6 y se adicionó el inductor (IPTG) en una concentración final de 1 mM. Después de 12 horas de expresión se colectaron las células por centrifugación (20 min, 10 000 rpm). El pellet se resuspendió en 15 mL de buffer de fosfatos pH 7.5 y se sonicó durante 5 minutos. Se recuperaron las fracciones por centrifugación (20 min, 10 000 rpm, a 4°C). Se analizaron las fracciones obtenidas en geles de acrilamida 12.5% SDS-PAGE (Anexo 6).

2.4 Purificación

2.4.1 Cromatografía de afinidad con resina de níquel (Ni-NTA, Invitrogen)

El extracto celular se incubó con la resina de Ni²⁺ equilibrada (Anexo 8) y se dejó en agitación durante 3 horas a una temperatura de 4°C para permitir la unión de la proteína al His-Tag con el Ni²⁺ de la resina. Posteriormente se dejó asentar la resina y se extrajo el sobrenadante y se lavó por 4 veces con el buffer de lavado. La proteína unida a la resina se recuperó en buffer de elución agitando durante 12 horas a 4°C, al término se dejó asentar la resina y se eluyó el buffer. Las fracciones colectadas se analizaron por SDS-PAGE 12.5%. La proteína recuperada se ultra-dializó contra buffer de 10 mM Tris-HCl pH 7.5 y se concentró a 15 mg/ml en celdas con agitación Amicon (Millipore) con membranas de ultrafiltración (Ultracel YM-10, Millipore).

2.5 Cuantificación de proteína

Se cuantificó la proteína a través de dos métodos: el de Lowry (Anexo 9) (Lowry *et al.*, 1951), y el método de hidrocloreuro de guanidina (Anexo 10).

2.6 Análisis de actividad ATPásica

Para la medición de actividad de ATPásica se siguió el protocolo propuesto por Santos (2002), en una mezcla de reacción compuesta por 10 µg de proteína recombinante y 50 µl de buffer de reacción (Anexo 11). Se incubó por 15 min a 65°C, se detuvo la reacción adicionando 800 µl de reactivo de color y 100 µl de citrato de sodio al 34% en solución. Se midió la absorbancia a 640 nm. Cada experimento se realizó por duplicado. La cuantificación del fosfato libre se realizó en paralelo contra una curva estándar de KH₂PO₄.

2.7 Ensayos de cristalización

Se utilizaron cajas de cristalización Cryschem™ plate (Hampton Research Corp.) especiales para realizar ensayos de cristalización por el método de sitting-drop. La búsqueda de las condiciones de cristalización de la proteína se realizó con dos kits de soluciones Crystal screen 1 y 2 (Hampton Research). Cada caja se etiquetó y se agregó 700 μ l de las soluciones de los *kits* en el reservorio inferior de los pozos y en la parte superior se adicionaron 20 μ l de las mismas soluciones y 5 μ l de la proteína purificada a una concentración de 5 a 15 mg/ml, se mezclaron evitando la formación de burbujas. Cada caja se selló con cinta adhesiva transparente y se dejaron incubar en un lugar libre de vibraciones. Para cada reacción se realizó en paralelo ensayos a temperatura ambiente, 37, 28 y 4°C.

3. Resultados y discusión

3.1 Amplificación y clonación en el vector de expresión

El *ORF* de TAA43 denominado Ta1175 está localizado en una región del genoma de *Thermoplasma acidophilum* considerada como un operón ribosomal, dentro de un agrupamiento de genes que incluyen dos proteínas ribosomales, un intrón de tRNA endonucleasa y dos tRNAs entre otros elementos asociados (Santos, 2003). Esta asociación y la interacción con proteínas ribosomales (Santos y Zwickl, 2005) es lo que se sugiere la participación de TAA43 en la disociación de proteínas *de novo* no-ribosomales que se encuentran asociadas a ribosomas.

En la figura 6A se muestran los productos de la amplificación (1100 pb) en geles de agarosa 1.2% con la banda del tamaño esperado.

Células de *E. coli* BL21pLysS fueron transformadas con la reacción de ligación y subsecuentemente fueron analizadas por restricción para determinar la presencia del inserto (Figura 6B).

Se obtuvieron un total de 10 clonas con el inserto, de todas estas clonas se hicieron respaldos en glicerol al 15% y 5 de ellas se analizaron para la expresión de la proteína recombinante TAA43. De acuerdo al análisis se seleccionó la clona con la cual se obtuvo expresión máxima de la proteína TAA43, y con esta se realizó la expresión.

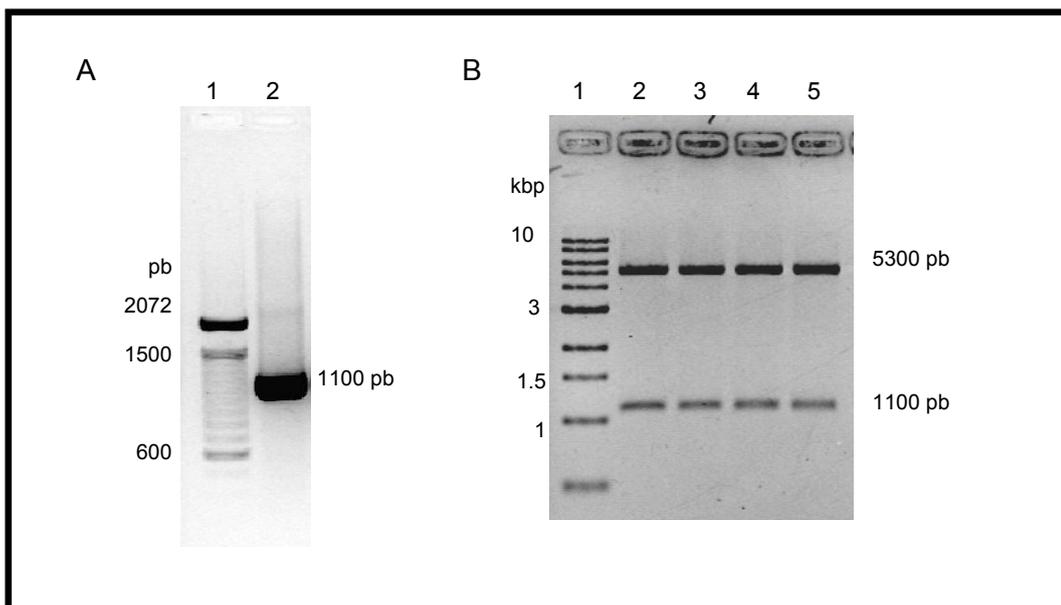


Figura 6 A) PCR del gen Ta1175. 1) Marcador de longitud 100 pb; 2) gen Ta1175. B) Análisis de restricción de clonas. 1) Marcador de 1 kbp; 2) al 5) Clonas positivas que contienen el gen Ta1175 (TAA43).

3.2 Expresión de la proteína recombinante TAA43

Se establecieron las condiciones óptimas de expresión en cultivos de 50 ml: se obtuvo 37°C como temperatura óptima y un tiempo de cultivo de 12 horas después de la inducción con IPTG. En la Figura 7 se muestra el análisis en SDS-PAGE al 12.5% (Anexo 6) de la expresión de TAA43 a diferentes tiempos después de la inducción, en la que se observa un aumento en la producción de proteína en función del tiempo. La mayor producción (25 mg/L) de TAA43 recombinante fue a las 8 horas de cultivo (Figura 7, carril 7).

Al analizar las fracciones celulares soluble e insoluble encontramos que la mayor concentración de proteína TAA43 recombinante expresada se localizaba en la fracción soluble por lo que no fue necesario utilizar ningún protocolo de

solubilización, subsecuentemente la purificación se realizó a través de una columna de afinidad en condiciones no desnaturizantes (Anexo 8).

El proceso de purificación con resina de níquel (Ni-NTA, Invitrogen) resultó eficiente, se obtuvo un porcentaje de pureza de 98% al eluir la proteína de la columna con una concentración de imidazol de 250 mM (Figura 8).

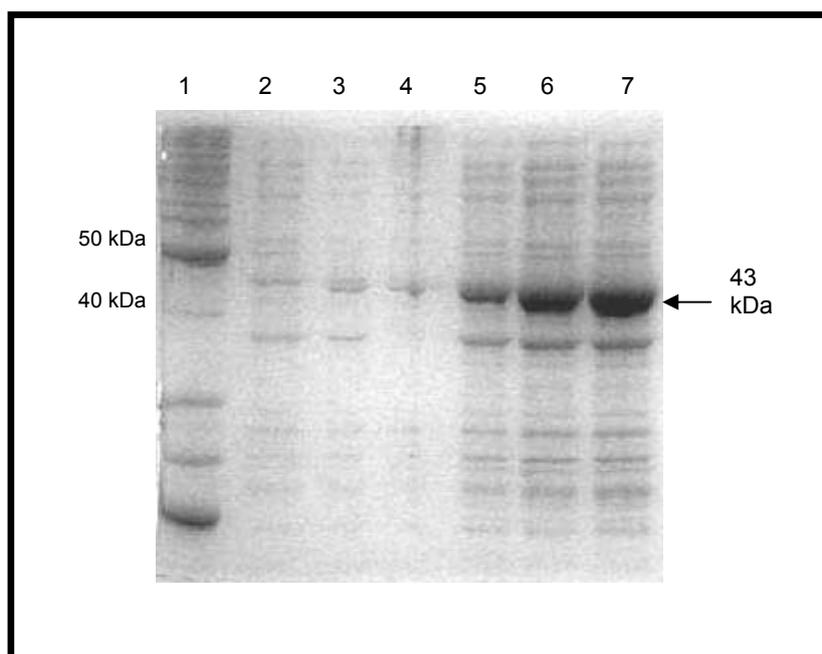


Figura 7. Análisis de expresión de TAA43. 1) Marcador de peso molecular; 2) tiempo cero a la inducción con IPTG; 3) 2 hrs de inducción; 4) 4 hrs de inducción; 5) 6 hrs de inducción; 6) 8 hrs de inducción; 7) 12 hrs de inducción.

La proteína purificada se ultra-dializó y concentró (ver materiales y métodos), para lograr tener la proteína libre de sales (imidazol y NaCl) y facilitar la formación de los cristales. Se logró concentrar la proteína a un máximo de 15 mg/ml, para realizar los ensayos de cristalización.

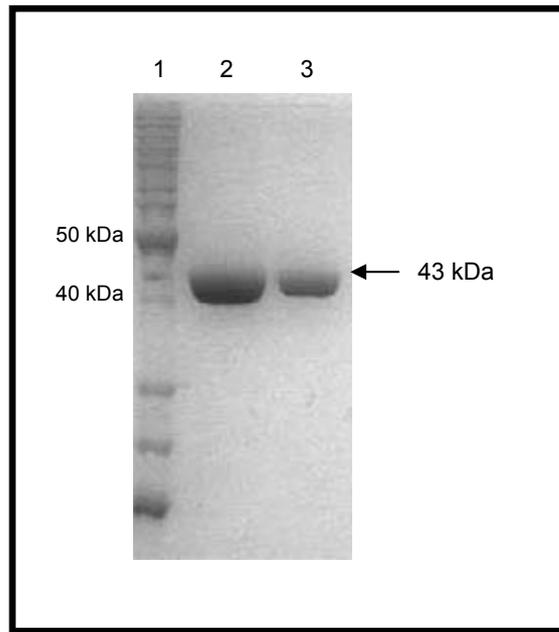


Figura 8. Purificación por columna de afinidad de TAA43. 1) Marcador de peso molecular; 2) TAA43 20 μ l; 3) TAA43 10 μ l.

3.3 Determinación de actividad enzimática

Para llevar a cabo la obtención de una estructura tridimensional bajo condiciones más cercanas al ambiente celular, además de estar pura y concentrada se necesita que la proteína recombinante presente actividad enzimática nativa. Debido a esto se verificó la actividad ATPásica de TAA43 recombinante, purificada y concentrada. La determinación de actividad ATPásica se realizó con el método de verde malaquita (Hess y Derr, 1975) (Anexo 10) que relaciona la absorbancia detectada con la cantidad de fosfato inorgánico libre ($\text{ATP} \rightarrow \text{ADP} + \text{Pi}$). La actividad específica de la proteína recombinante TAA43 purificada fue de 47 nmol Pi/mg min. La enzima

recombinante activa y concentrada a 5, 10 y 15 mg/ml se utilizó para los ensayos de cristalización.

3.4 Cristalización de TAA43

3.4.1 Características de TAA43

Como se mencionó anteriormente varias ATPasas AAA han sido caracterizadas (HslU, Bochtler *et al.*, 2000, p97, Zhang *et al.*, 2000, Cdc6, Liu *et al.*, 2000, RuvB, Yamada *et al.*, 2001, NSF, Lenzen *et al.*, 1998) y estructuralmente tienen la característica de formar anillos hexaméricos y esta oligomerización esta asociada con la actividad ATPásica además de llevar a cabo funciones celulares como desdoblamiento y plegamiento de proteínas nativas y plegamiento de polipéptidos/péptidos para la homeostasis celular (Ogura y Wilkinson, 2001). Dentro de estas la estructura de p97 esta compuesta por dos dominios AAA y en su estructura tridimensional se observa que la región N-terminal consiste en un barril doble $\beta\alpha\beta$ unido por seis residuos a cuatro láminas β , la región central comprende estructuras β/α y contienen el dominio Walker A (P loop) y B (DExx), dominios involucrados en la interacción con nucleótidos, y la región C-terminal compuesta por cuatro α -hélices (Zhang, *et al.*, 2000). Básicamente estas estructuras se conservan en los monómeros de las ATPasas AAA. El dominio AAA de p97 es un modelo utilizado para el estudio general de las proteínas AAA, que tienden a formar hexámeros.

En la caracterización de TAA43 (Santos, 2003), se encontró que tiende a formar dímeros, una característica no común entre este tipo de ATPasas, y se

propone que estos dímeros de TAA43 pueden formar parte de un gran complejo molecular. Con estos datos y la información obtenida por ensayos de interacción con proteínas ribosomales nos da una idea de su participación, en un gran complejo de proteínas asociadas a ribosomas.

Debido a la naturaleza dimérica de TAA43 y su participación en eventos celulares poco descritos todavía queda por dilucidar varias incógnitas, la información obtenida a partir de su estructura tridimensional por medio de la cristalización, aportará información determinante de la función de esta proteína.

3.5 Ensayos de cristalización de TAA43

Las condiciones óptimas para la nucleación y crecimiento de cristales son difíciles de predecir y es necesario utilizar una herramienta eficiente y efectiva para determinar las condiciones iniciales de cristalización de una proteína. La gran variedad de las soluciones compuestas de sales, solventes orgánicos, polímeros y una amplia gamma de pH's de los kits Crystal screen 1 y 2, (Hampton Research), permitió desarrollar un rastreo de amplio espectro para la búsqueda de las condiciones idóneas para el crecimiento de cristales de TAA43.

Se realizaron 1200 ensayos de cristalización, de los cuales se formaron monocristales en las condiciones de la tabla 1 y Figuras 9-13. En todas las condiciones en las que se obtuvieron cristales, la incubación de las placas fue a temperatura ambiente (25°C) (Tabla 1). A los cristales obtenidos se les realizaron pruebas de resistencia y de tinción (Crystal dye, Hampton Research) para descartar que fueran cristales salinos.

Tabla 1. Condiciones de crecimiento de cristales de TAA43 a 25°C

Condiciones	Características	Forma	Tiempo (meses)
0.2 M acetato de zinc dihidratado 0.1 M cacodilato de sodio pH 6.0 18% w/v polietilen-glicol 8000	Micro-cristales	Estrellas	1
0.2 M acetato de zinc dihidratado 0.1 M cacodilato de sodio pH 6.5 18% w/v polietilen-glicol 8000	Cristales	Estrellas	1
1.0 M Imidazol pH 7.0	Cristales	Cuentas	2
0.1 M cloruro de cadmio dihidratado 0.1 M acetato de sodio trihidratado pH 4.0 30% v/v polietilen-glicol 400	Cristal	Circular	10
0.2 M Cloruro de magnesio dihidratado 0.1 M HEPES-Na pH 7.5 30% v/v isopropanol	Cristal	Circular	8
0.2 M Cloruro de magnesio hexahidratado 0.1 M Tris-HCl pH 8.5 30% polietilen-glicol 4000	Micro-cristales	Anillos	12
0.2 M Cloruro de magnesio hexahidratado 0.1 M HEPES-Na pH 7.5 30% polietilen-glicol 400	Cristales	Anillos	10
0.2 M Acetato de magnesio tetrahidratado 0.1 M Cacodilato de sodio pH 6.5 30% v/v 2-metil-2,4 pentadiol	Cristales	Anillos (3)	11
0.1 M Tris - HCl pH 8.5 8% w/v polietilen-glicol 8000	Micro-cristales	Anillos	9
0.1 M Tris-Citrato de sodio dihidratado pH 5.6 20% v/v Isopropanol 20% polietilen-glicol 4000	Micro-cristales	Circulares (3)	9
0.1 M HEPES-Na pH 7.5 10% v/v isopropanol, polietilen-glicol 4000	Micro-cristales	Anillos	6
0.35 M imidazol pH 6	Micro-cristal	Circular	3
0.01 Sulfato de Zinc heptahidratado 0.1 MES pH 6.5 30% polietilen-glicol 4000	Micro-cristales	Circulares (4)	8
0.2 M cloruro de magnesio hexahidratado 0.1 M Tris pH 8.5 3.4 M hexadiol	Micro-cristal	Cuadrado lados irregulares	6
0.5 M cloruro de sodio 0.01 M cloruro de magnesio hexahidratado 0.01 M bromuro de hexadeciltrimetilamonio	Cristal	Piramidal	11
0.2 M acetato de zinc dihidratado 0.1 M cacodilato de sodio pH 8.0 18% w/v polietilen-glicol 4000	Micro-cristales	Estrellas	6
0.2 M acetato de zinc dihidratado 0.1 M cacodilato de sodio pH 7.5 18% w/v polietilen-glicol 4000	Micro-cristales	Estrellas	3
0.2 M acetato de zinc dihidratado 0.1 M cacodilato de sodio pH 7.0 18% w/v polietilen-glicol 4000	Micro-cristales	Estrellas	3

0.2 M acetato de zinc dihidratado 0.1 M cacodilato de sodio pH 6.0 18% w/v polietilen-glicol 4000	Micro-cristales	Estrellas	2
0.2 M acetato de zinc dihidratado 0.1 M cacodilato de sodio pH 5.5 18% w/v polietilen-glicol 4000	Micro-cristales	Agujas	1

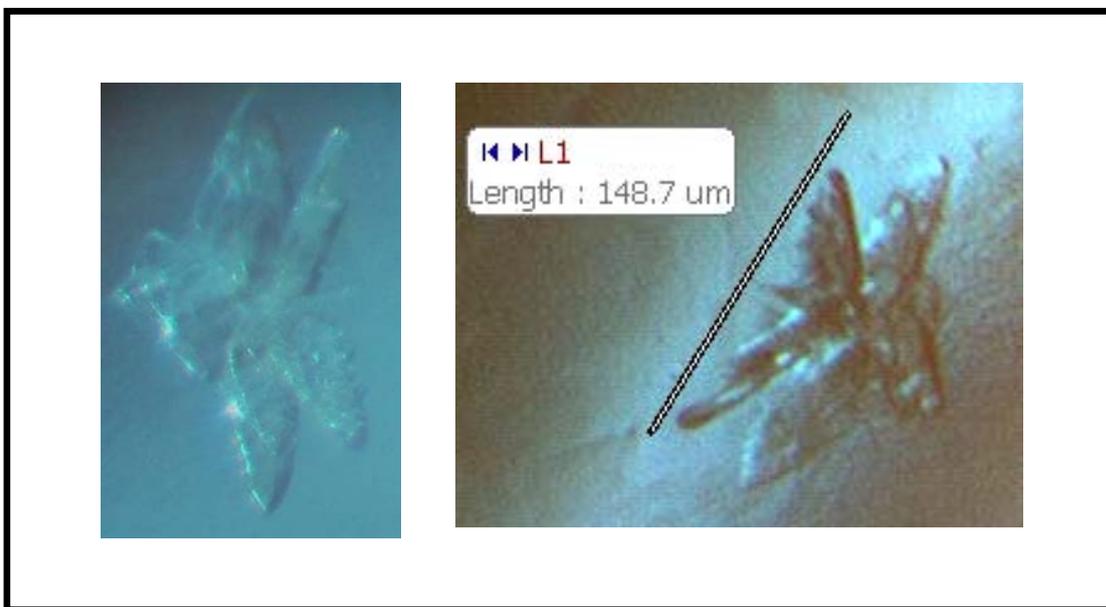


Figura 9. Cristal obtenido después de 1 mes de incubación a 25°C. Condiciones: 0.2 M acetato de zinc di-hidratado; 0.1 M cacodilato de sodio pH 6.5; 18% w/v polietilenglicol 8000. (Length: longitud)

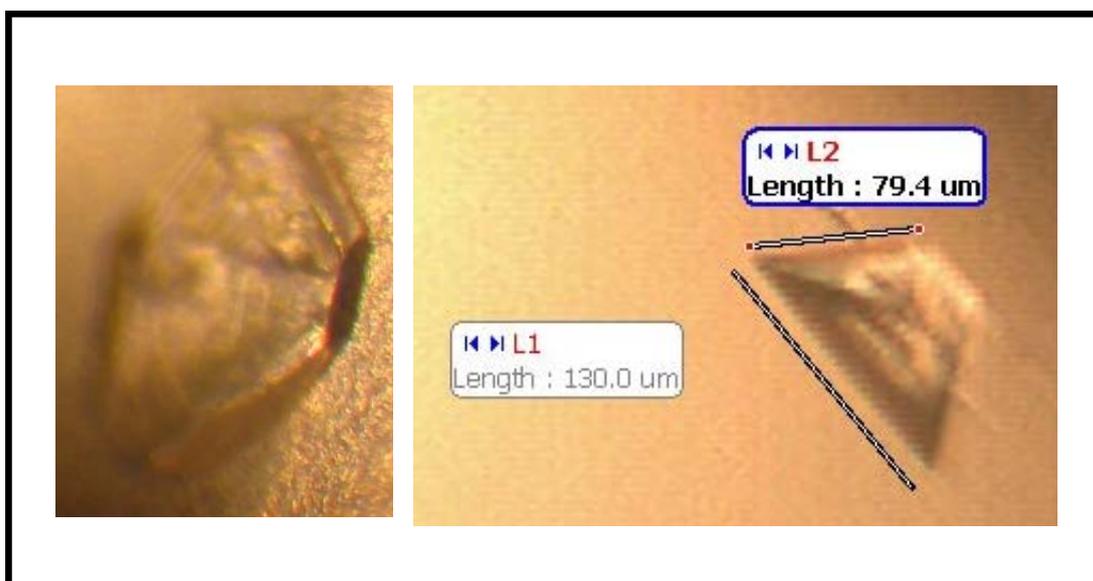


Figura 10. Cristales obtenidos a 11 meses de incubación a 25°C. Condiciones: 0.2 M citrato trisódico di-hidratado; 0.1 M HEPES-Na pH 7.5; 20% v/v isopropanol. (Length: longitud)

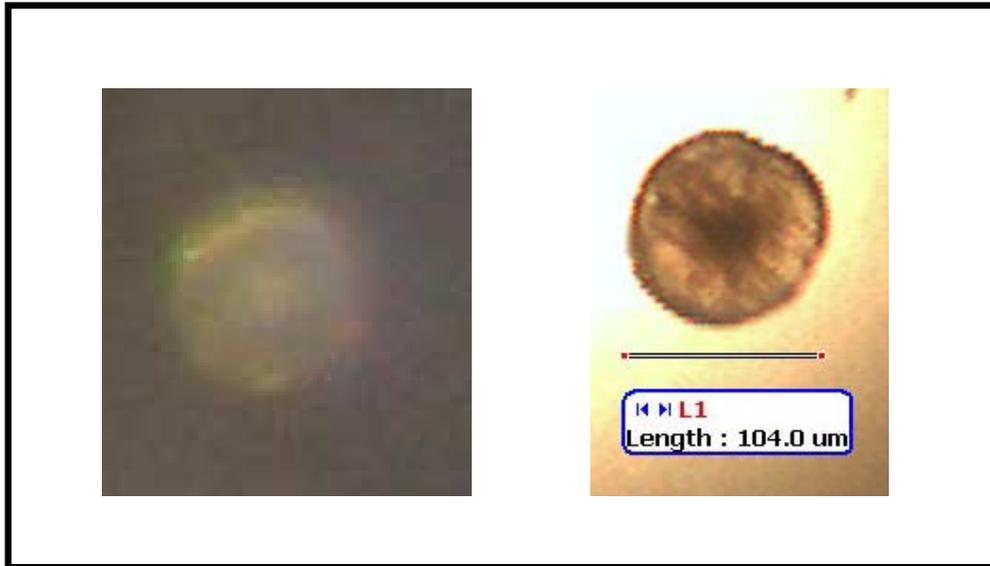


Figura 11. Cristales obtenidos a 10 meses de incubación a 25°C. Condiciones: 0.1 M cloruro de cadmio dihidratado; 0.1 M acetato de sodio tri-hidratado pH 4.6; 30% v/v polietilenglicol 400. (Length: longitud)

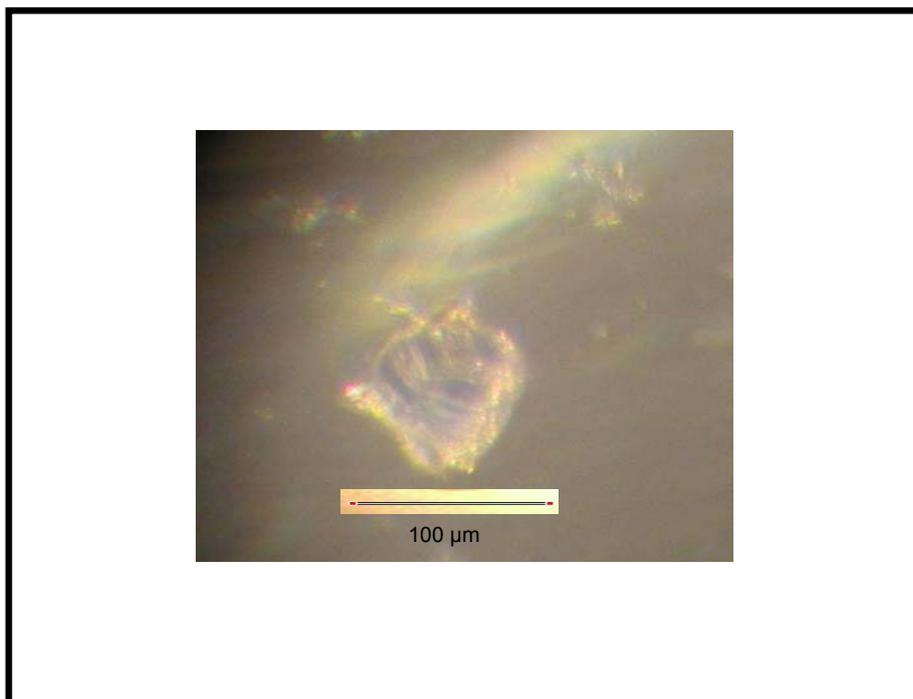


Figura 12. Cristal obtenido a los 6 meses de incubación con las condiciones: 0.2 M cloruro de magnesio hexa-hidratado; 0.1 M tris pH 8.5; 3.4 M hexadiol.

Los mejores cristales de acuerdo al tamaño y pruebas de resistencia fueron obtenidos a 25°C en 0.2 M acetato de zinc di-hidratado, 0.1 M cacodilato de

sodio pH 6.5, 18% w/v polietilenglicol 8000 (Figura 9). En base a estos resultados se llevaron a cabo nuevos ensayos modificando algunos factores: 1) se realizó un *seeding* con fragmentos del cristal, que consiste en incubar repitiendo las condiciones de cristalización (agentes precipitantes y cantidad de proteína) en presencia de fragmentos de los cristales anteriormente obtenidos, 2) se aumentó la concentración de la proteína (15 mg/ml), 3) se incubó a diferentes pHs (rango de 4.5 – 8.0). Estas modificaciones son recomendadas para favorecer la formación de cristales más grandes y con mejor calidad para los análisis de difracción por rayos X. De estos ensayos se han obtenido hasta el momento solo cristales pequeños (Figura 13).

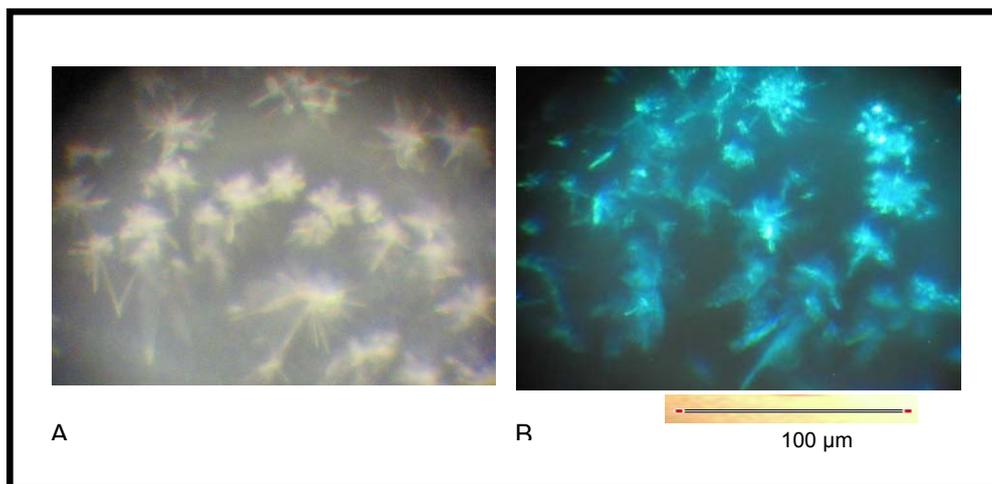


Figura 13. Cristales obtenidos del *seeding* en, A) 3 meses y B) 6 meses de incubación.

3.6 Difracción preliminar

Se realizó una difracción preliminar para determinar la naturaleza de los cristales obtenidos y diferenciarlos de cristales no proteínicos. Los cristales que contienen proteína difractan de manera distinta a aquellos cuyo contenido es solamente salino como se ilustra en la Figura 14. La difracción preliminar se

llevó a cabo en un difractómetro de rayos X para polvos D8-ADVANCED (Bruker, División de Materiales Avanzados, IPICYT). Este aparato detecta la fase cristalina de las muestras y puede determinar la composición de las sustancias en estudio por comparación de los patrones de difracción obtenidos. En la figura 15 se observa que los cristales de TAA43 (incubación a 25°C en 0.2 M acetato de zinc di-hidratado, 0.1 M cacodilato de sodio pH 6.5, 18% w/v polietilenglicol 8000) difractan y son representados en el gráfico por el aumento de cuentas Lin [escala lineal de la intensidad ejemplificada en el eje de las Y, Lin (Counts)] contra la escala 2-Theta (ángulo de incidencia). En contraparte se puede observar la solución control (puntos negros), en la que se desarrollaron los cristales de TAA43.

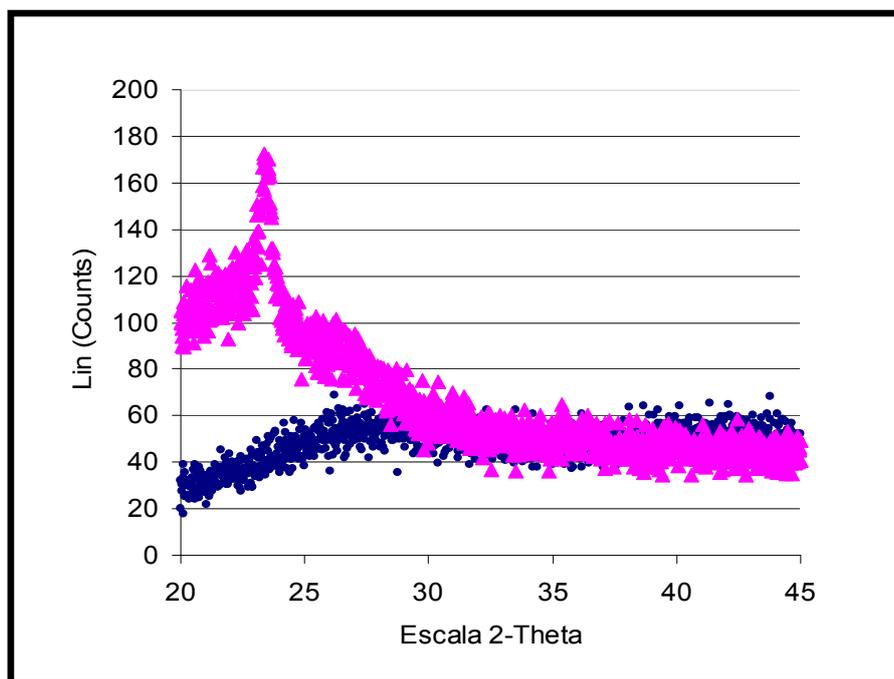


Figura 14. Patrones de difracción de rayos X preliminar. ▲ Difracción de cristales de TAA43; ■ Difracción de la solución control.

Con estos resultados se confirmó que los cristales generados son proteínicos, sin embargo, no tienen las características necesarias (forma, tamaño, calidad)

para efectuar en ellos la difracción de rayos X en sincrotrón. El desarrollo de nuevos cristales se generará como producto de los ensayos de *seeding* antes descritos. Se espera elucidar la estructura tridimensional de la proteína con cristales más grandes y de mejor calidad para la obtención de los mapas de difracción.

4. Avances

- La ATPasa TAA43 fue eficazmente producida 25 mg/l en *E. coli* BL21 pLysS, logrando purificar y concentrar cantidad suficiente de proteína (hasta 15 mg/ml) activa para llevar a cabo los ensayos de cristalización.
- Se logró identificar algunas de las condiciones de incubación en las que crecieron cristales de TAA43.
- Con los monocristales se llevaron a cabo nuevos ensayos de cristalización cuyo objetivo es generar cristales más robustos y de mejor calidad para su análisis por difracción de rayos X.

5. Perspectivas

- Continuar con el monitoreo de los ensayos de cristalización.
- Utilizar un método de cristalización diferente a sitting-drop con las condiciones en las que se obtuvieron cristales para mejorar la calidad de estos (e.g. micro-batch, micro-diálisis, crecimiento de cristales en capilares de cuarzo)
- Obtener la estructura tridimensional de TAA43 en colaboración con expertos en cristalografía.

6. Referencias

- Benneman, P (1974). Crystal growth from solution-theory and experiments. *J Cryst Growth* 24:76.
- Bochtler, M, Hartmann, C, Song, HK, Bourenkov, GP, Bartunik, HD y Huber, R (2000). The structures of HslU and the ATP-dependent protease HslU-HslV. *Nature* 403:800-805.
- Darland, G, Brock, TD, Samsonoff, W y Conti, SF (1970). A thermophilic, acidophilic mycoplasma isolated from a coal refuse pile. *Science* 170:1416-1418.
- Hanson, PI y Whiteheart, SW (2005). AAA+ proteins: have engine, will work. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:519-529.
- Hess, HH y Derr, JE (1975). Assay of inorganic and organic phosphorus in the 0.1-5 nanomole range. *Anal Biochem* 63:607-613.
- Hsung, JC y Haug, A (1975). Intracellular pH of *Thermoplasma acidophila*. *Biochim Biophys Acta* 389:477-482.
- Jenkins, WT (1998). Three solutions of the protein solubility problem. *Protein Sci* 7:376-382.
- Lenzen, CU, Steinmann, D, Whiteheart, SW y Weis, WI (1998). Crystal structure of the hexamerization domain of N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein. *Cell* 94:525-536.
- Liu, J, Smith, CL, DeRyckere, D, DeAngelis, K, Martin, GS y Berger, JM (2000). Structure and function of Cdc6/Cdc18: implications for origin recognition and checkpoint control. *Mol Cell* 6:637-648.

- Lowry, OH, Rosebrough, NJ, Farr, AL y Randall, RJ (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275.
- McPherson, A (1999). *Crystallization of Biological Macromolecules*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Ogura, T y Wilkinson, AJ (2001). AAA+ superfamily ATPases: common structure--diverse function. *Genes Cells* 6:575-597.
- Peters, JM, Walsh, MJ y Franke, WW (1990). An abundant and ubiquitous homo-oligomeric ring-shaped ATPase particle related to the putative vesicle fusion proteins Sec18p and NSF. *EMBO J* 9:1757-1767.
- Rosenberger F. (1986) Inorganic and protein crystal growth –similarities and differences. *J.Cryst. Growth* 76: 618-636.
- Ruepp, A, Graml, W, Santos-Martinez, ML, Koretke, KK, Volker, C, Mewes, HW, Frishman, D, Stocker, S, Lupas, AN y Baumeister, W (2000). The genome sequence of the thermoacidophilic scavenger *Thermoplasma acidophilum*. *Nature* 407:508-513.
- Santos, L (2002). Genome Sequencing of *Thermoplasma acidophilum* and Characterization of the Translation-Associated ATPase of 43 kDa (TAA43), a member of the AAA⁺ Family. <http://mediatum2.ub.tum.de/node?id=601247>, (Published doctoral thesis online, Technical University Munich).
- Santos, L, Frickey, T, Peters, J, Baumeister, W, Lupas, A y Zwickl, P (2004). *Thermoplasma acidophilum* TAA43 is an archaeal member of the eukaryotic meiotic branch of AAA ATPases. *Biol Chem* 385:1105-1111.
- Santos, L y Zwickl, P (2005). Interaction analysis of the AAA ATPase TAA43 by the bacterial two-hybrid system. *FEMS Microbiol Lett* 254:293-299.

- Sarig, S (1994). Fundamentals of aqueous solution crystal growth. Amsterdam, Holland.
- Schiraldi, C, Giuliano, M y De Rosa, M (2002). Perspectives on biotechnological applications of archaea. *Archaea* 1:75-86.
- Seegerer, A, Stetter, KO y Klink, F (1985). Two contrary modes of chemolithotrophy in the same archaeobacterium. *Nature* 313:787-789.
- Stetter, KO (1996). Hyperthermophiles in the history of life. *Ciba Found Symp* 202:1-10; discussion 11-18.
- Woese, CR (1977). A comment on methanogenic bacteria and the primitive ecology. *J Mol Evol* 9:369-371.
- Yamada, K, Kunishima, N, Mayanagi, K, Ohnishi, T, Nishino, T, Iwasaki, H, Shinagawa, H y Morikawa, K (2001). Crystal structure of the Holliday junction migration motor protein RuvB from *Thermus thermophilus* HB8. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:1442-1447.
- Zhang, X, Shaw, A, Bates, PA, Newman, RH, Gowen, B, Orlova, E, Gorman, MA, Kondo, H, Dokurno, P, Lally, J, Leonard, G, Meyer, H, van Heel, M y Freemont, PS (2000). Structure of the AAA ATPase p97. *Mol Cell* 6:1473-1484.

III

“Producción heteróloga y caracterización de la
alcohol deshidrogenasa proveniente de
Thermoplasma acidophilum”

Resumen

Del análisis del genoma de *Thermoplasma acidophilum* DSM 1782 se identificaron dos *orfs* similares a las alcohol deshidrogenasas. Los genes correspondientes a estos *orfs* son los denominados *Ta0841* y *Ta1316*, la identidad entre ellos es de 50.4% y codifican para dos proteínas de 336 y 328 aminoácidos con un peso molecular del 36.48 y 36.01 kDa respectivamente. Los genes se expresaron en *Escherichia coli* y se comprobó la funcionalidad de las proteínas recombinantes por medio de la evaluación de su actividad. En este trabajo solo *Ta1316* ADH fue activa en la reacción de oxidación de alcoholes en un rango de pH de 2-8 (pH óptimo 5.0) y dentro de un rango de temperatura de 25-90°C (temperatura óptima 75°C). Esta alcohol deshidrogenasa utiliza a NAD^+ como cofactor y cataliza la oxidación de varios tipos de alcoholes como son etanol, metanol, 2-propanol, butanol y pentanol. Su máxima actividad se encontró en presencia de etanol como sustrato, a un pH de 5.0 y a una temperatura de 75°C, con estas condiciones óptimas la actividad específica de la enzima *Ta1316* ADH fue de 628.7 U/mg.

Abstract

Analysis of the *Thermoplasma acidophilum* DSM 1728 genome identified two putative alcohol dehydrogenase *orfs* showing 50.4% identity against each other. The corresponding genes *Ta0841* and *Ta1316* encode proteins of 336 and 328 amino acids with molecular masses of 36.48 and 36.01 kDa respectively. The genes were expressed in *Escherichia coli* and the recombinant enzymes were functionally assessed for enzymatic activity. Throughout the study, only Ta1316 ADH resulted active in the oxidative reaction in the pH range 2-8 (optimal pH 5.0) and temperatures from 25-90°C (optimal 75°C). This alcohol dehydrogenase catalyzes the oxidation of several alcohols such as ethanol, methanol, 2-propanol, butanol, and pentanol during the reduction of the cofactor NAD⁺. The highest activity was found in the presence of ethanol producing optically pure acetaldehyde. The specific enzyme activity of the purified Ta1316 ADH with ethanol as a substrate in the optimal conditions was 628.7 U/mg.

1. Introducción

1.1 Enzimas extremófilas (Termozimas)

Las enzimas termofílicas e hipertermofílicas (termozimas) son intrínsecamente estables y activas a altas temperaturas, y difieren de las enzimas mesófilas o psicrófilas (activas a 25-50°C y 5-25°C respectivamente) al poseer las siguientes ventajas: 1) pueden ser expresadas en hospederos mesófilos reteniendo las propiedades biológicas nativas y pueden ser purificadas fácilmente por tratamiento térmico; 2) su termoestabilidad esta asociada con una alta resistencia a denaturalizantes químicos como solventes e hidrocloreuro de guanidina; y 3) realizan reacciones enzimáticas con altas tasas de conversión a temperaturas elevadas permitiendo además una alta concentración de sustrato, baja viscosidad, y reduciendo riesgo de contaminación por microorganismos (Vieille y Zeikus, 2001). Las termozimas son ampliamente utilizadas en el área de Biología Molecular (e.g. *Taq* polimerasa), como aditivos en detergentes (e.g. proteasas), en la industria del procesamiento del almidón (e.g. α -amilasas, glucosa isomerasas) y son excelentes candidatos catalíticos para numerosas aplicaciones en las que se requiere una alta estabilidad. Estas aplicaciones incluyen la síntesis orgánica (e.g. lipasas, proteasas, oxidoreductasas), diagnóstico, tratamiento de

desechos, manufactura de papel y alimentación animal (Vieille y Zeikus, 1996). Otras termozimas son utilizadas en la catálisis de una gran variedad de procesos sintéticos como la citocromo P450, las alcohol deshidrogenasas y varias glucosil hidrolasas que muestran regio-selectividad y/o estereoselectividad, que son propiedades deseables para la síntesis química (Vieille y Zeikus, 2001).

1.2 Alcohol deshidrogenasa (ADH)

Las alcohol deshidrogenasas (ADHs) son enzimas que realizan reacciones catalíticas oxidoreductoras (EC 1.1.1.1). Están ampliamente distribuidas en los seres vivos, ya que juegan papeles esenciales en los mecanismos de defensa celular desde procariotes hasta humanos. Son importantes para la detoxificación y metabolismo del etanol y otros alcoholes, catalizan la oxidación de alcoholes primarios y secundarios dependiente de cofactor a sus correspondientes aldehídos y cetonas (Littlechild *et al.*, 2004).

Un tipo particular de ADH cataliza la reacción de interconversión del acetaldehído y etanol, la cual constituye el paso final en la fermentación alcohólica en levaduras y el paso inicial en el metabolismo del etanol en una amplia variedad de organismos como por ejemplo levaduras, bacterias, *Drosophila*, maíz y humanos. En *Drosophila* y otros organismos la expresión de ADH tiene regulación dependiente de la etapa del desarrollo (Sofer y Martin, 1987), de las condiciones ambientales (Kelly *et al.*, 1990; Saliola *et al.*, 1994) y del tejido u órgano de que se trate. También tiene participación en eventos de

interés biotecnológico, como la producción de etanol, de bebidas y alimentos que lo contienen, así como en la producción de otros solventes.

1.3 Clasificación de las ADHs

Las ADHs se clasifican de acuerdo al aceptor de electrones que utilizan (Persson *et al.*, 1991; Reid y Fewson, 1994) en:

- 1) ADHs dependientes de NAD(P) (Nicotin Adenin Dinucleotido):



Estas a su vez se subclasifican en 3 grupos:

Grupo I: De cadena media, contienen subunidades de aproximadamente 350 aminoácidos y la mayoría son dependientes de zinc.

Grupo II: De cadena corta, con subunidades de 250 aminoácidos, son independientes de metales.

Grupo III: Ferro – activas, contienen subunidades de 385 – 900 aminoácidos (multifuncionales). Todas las ADHs que se han descrito de este grupo son microbianas.

- 2) ADHs que utilizan como cofactor pirroquinolina quinona, hemo, o cofactor F₄₂₀.



En esta familia se incluye a la metanol deshidrogenasa de *Paracoccus denitrificans*, la etanol deshidrogenasa de *Acetobacter* y *Gluconobacter sp.*, así como ciertas ADHs de bacterias.

1.4 Características de estructura de las ADH-NAD(P) dependientes

La estructura tridimensional de la alcohol deshidrogenasa de hígado de caballo se reportó en 1973 (Branden *et al.*, 1973) así como varias ADHs de diversos organismos que han sido extensivamente estudiadas y se han identificado regiones de aminoácidos con secuencias características. La unión de la ADH con su cofactor se realiza a través del motivo denominado “*finger print*” que consiste en una cadena de seis hojas β -plegadas rodeadas por seis α -hélices (Rossmann y Argos, 1981). La secuencia de aminoácidos que componen este motivo es Gly-x(x)-Gly-x(x)-Gly (Kalberg y Persson, 2006). Las dos primeras glicinas están involucradas en la unión al cofactor, mientras que la tercer glicina esta involucrada en las interacciones de las estructuras de hojas β -plegada y α -hélice cuya función es ayudar al correcto plegamiento de la enzima.

La mayoría de las ADH-NAD(P) dependientes caracterizadas son dependientes de zinc y conservan en su secuencia aminoácidos (cisteína, histidina, ácido aspártico) para la unión a dicho compuesto. Las ADH de cadena media unen a dos átomos de zinc por subunidad, uno para el sitio de unión catalítico y otro para el sitio de unión estructural. Los cuatro residuos de unión a zinc estructural son Cys-98, Cys-101, Cys-104 y Cys-112. Los residuos ligandos de zinc catalítico son Cys-38, His-62 y Asp-153 (Esposito *et al.*, 2002).

1.5 Aplicaciones biotecnológicas de las ADH

Las ADHs pueden utilizarse en pilas de combustible de etanol, para catalizar la degradación del combustible. En biotransformación, son utilizadas frecuentemente para la síntesis de alcoholes puros. Al contrario de los procesos químicos, las ADHs producen directamente el enantiómero deseado del alcohol por reducción de la cetona correspondiente (Hammes-Schiffer y Benkovic, 2006). Los compuestos quirales juegan un papel importante en la síntesis orgánica de compuestos farmacéuticos. Una gran variedad de ADHs muestran características prometedoras para ser utilizadas en la síntesis biocatalítica de valiosos intermediarios quirales. Entre las ADHs mesofílicas destacan dos ejemplos comercialmente disponibles que son frecuentemente utilizadas en laboratorios de química orgánica para síntesis de compuestos quirales; son las ADHs de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) y la de hígado de caballo. Estas se utilizan en la preparación de (1 S, 2R)-cis-2-carboximetil-3-ciclopenteno-1-ol lactona, que es metabolito inicial para la síntesis de prostaglandinas. Sin embargo la limitante en el uso de estas enzimas mesofílicas es su inestabilidad a temperaturas arriba de 30°C (Hummel y Kula, 1989), además de presentar sensibilidad a solventes orgánicos (Inoue *et al.*, 2005) y baja especificidad a sustratos. Por estas razones existe una búsqueda continua de ADHs con mejores propiedades y así dar solución a estas limitaciones.

La ADH termoestable de *Thermoanaerobium brockii* es ampliamente utilizada en el proceso de preparación de productos farmacéuticos. El gran potencial de ADHs termoestables para la industria farmacéutica se demuestra en la preparación del (S)-2-pentanol, un intermediario clave en la síntesis orgánica de algunos posibles compuestos con actividad inhibitoria en enfermedades

neurodegenerativas como es el Alzheimer (Patel, 2004). Indudablemente los organismos termo-acidofílicos son una fuente promisoría de biocatalizadores con las características de ser estables y activos bajo condiciones de reacción extremas (Egorova y Antranikian, 2005). *T. acidophilum* es un organismo termo-acidofílico, que contiene en su genoma dos marcos de lectura cuya secuencia de aminoácidos son similares a las enzimas alcohol deshidrogenasas. En este trabajo se describe la producción en *E. coli* y la caracterización enzimática de las proteínas Ta0841 y el Ta1316 provenientes de *T. acidophilum*.

2. Materiales y Métodos

2.1 Obtención de los genes Ta0841 y Ta1316

El ADN genómico de *Thermoplasma acidophilum* fue donado por el laboratorio de Biología Molecular Estructural del Instituto Max Planck, Alemania (Ruepp *et al.*, 2000). Los genes Ta0841 y Ta1316 se amplificaron por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En base a las secuencias de cada uno de los genes obtenidas de la base de datos (no. de acceso NP344301 y CAC12437 respectivamente) se diseñaron oligonucleótidos específicos para clonar los genes completos (Tabla 1), con los cuales se adiciona a las secuencias dos sitios de corte para las enzimas *NcoI* y *XhoI* en los extremos 5' y 3' respectivamente. Para la PCR, la mezcla de reacción se realizó manteniéndola a 4°C. Para cada reacción se utilizó 78 ng de ADN genómico de *T. acidophilum*, 0.2 µM de cada oligonucleótido, mix 0.02 mM de dNTP's (Invitrogen), 2 mM de MgCl₂, 1 U de polimerasa de alta fidelidad *Tli* (Promega) y buffer PCR 1X en un volumen final de 50 µl. El programa de amplificación se programo en un termociclador (BioRad) con un calentamiento inicial a 94°C durante 4 minutos, seguido por 25 ciclos de 94°C por un minuto, 57°C por un minuto y 72°C por un minutos, seguido por una extensión final a 72°C durante 10 minutos. Al término los productos de PCR se limpiaron con un kit de limpieza para productos de PCR (Invitrogen) (Anexo 1). Posteriormente se sometieron una extensión con *Taq* polimerasa para agregar los extremos poliA en las secuencias adicionando PCR buffer 1X, 2 mM MgCl₂, mix 1 mM dNTP's y 1 U de *Taq* Polimerasa (Invitrogen). Los análisis de los productos de la amplificación se analizaron en geles de agarosa al 1% (Anexo 2).

Tabla 1. Oligonucleotidos específicos para la amplificación de los genes completos de Ta0841 y Ta1316 ADHs

Nombre	Secuencia
Ta0841 sense	5' GCGCGCATCATGAAGGCAGCCCTACTAG 3'
Ta0841 antisense	5' CCGCTCGAGACTAAATTTAATCAGAACACG 3'
Ta1316 sense	5' CATGGCATGGCAGCTGCTCTTGTATATGAACCG 3'
Ta1316 antisense	5' CCG CTC GAG GGA TAC TCT CAT CGA TAT G 3'

2.2 Plásmido de expresión

La clonación de los insertos de los genes amplificados se realizó utilizando el plásmido de expresión pET28a+ (Invitrogen).

2.2.1 Clonación de *Ta0841* y *Ta1316*

Se realizaron digestiones independientes con 1 µg del vector y 10 µg de los insertos amplificados respectivamente, adicionando 1 U de cada una de las enzimas (*NcoI* y *XhoI*, Invitrogen) y buffer de reacción 1X final, en un volumen final de 15 µl. La reacción se incubó en un termomixer a 37°C durante 1 hora y 30 minutos. Posterior a la digestión del vector pET28a+ se realizó la fosforilación de los extremos digeridos con 1 U de fosfatasa alcalina de camarón (SAP, USB), incubando a 37°C durante 1 hora, al término se inactivó la enzima a 65°C durante 15 minutos.

La ligación se realizó en un volumen final de 20 µL con 1 U de *ligasa T4* (Promega), buffer de ligación rápida (Promega) 1X final y 1:3 de la relación vector:inserto, determinada por análisis comparativo en gel de agarosa. La reacción se incubó en termomixer a 17°C por un periodo de 12 horas.

2.2.2 Transformación

Se prepararon células competentes por el método de cloruro de rubidio (Anexo 3). A cada vial de 100 μ l de células competentes se les agregó 10 μ l de la ligación y se incubaron 30 minutos en hielo, posteriormente se incubó a 42°C por 45 segundos y al término se colocó en hielo por 1 minuto. Después de este procedimiento se adicionó 300 μ l de medio líquido LB (Anexo 4) y se incubaron a 37°C en agitación constante durante 1 hora. Las células se sembraron en placas de LB agar con antibiótico de selección (Anexo 4) y se incubaron durante toda la noche a 37°C. Se seleccionaron colonias y se cultivaron en 3 ml de medio líquido LB (Anexo 4).

2.2.3 Minipreparaciones (kit Qiaprep, Qiagen)

La purificación de las construcciones (*pET28+Ta0841* y *pET28+Ta1316*) se realizó de acuerdo a las instrucciones del kit (Anexo 5). Las construcciones se verificaron por análisis de restricción con las enzimas *NcoI* y *XhoI*, para la liberación del inserto. Las construcciones positivas (Figura 2B), se secuenciaron para asegurar la fidelidad de las secuencias del inserto. De las clonas positivas se hicieron respaldos con glicerol al 15% y se almacenaron a -70°C, para el trabajo posterior.

2.3 Expresión

Se seleccionó una clona positiva para la expresión de cada una de las proteínas recombinantes (Ta0841 y Ta1316). Se realizaron ensayos de expresión en 50 ml de medio LB para determinar las condiciones de temperatura y tiempo óptimo de incubación después de la inducción y se

escaló a 1 L de medio. Para la expresión se preparó un preinóculo a partir de la clona positiva en 25 ml de medio LB con antibióticos (Anexo 4) y se incubó durante 12 horas a 37°C. Se calculó la cantidad de preinóculo necesaria para iniciar el cultivo con una densidad óptica (OD) de 0.2 (600 nm) en 1 L de medio LB y se incubó a 37°C, hasta que la OD alcanzó un valor de 0.6. En ese momento se adicionó el inductor (IPTG) a una concentración final de 1 mM. Después de 8 horas de expresión se centrifugó el cultivo (20 min, 20 000 g). El pellet celular se resuspendió en 15 ml de buffer de fosfatos pH 7.5, se sonicó durante 5 minutos y las fracciones solubles e insolubles se recuperaron por centrifugación (20 min, 20 000 g, a 4°C). Las fracciones obtenidas se analizaron en geles de acrilamida 12.5% SDS-PAGE (Anexo 6). A la fracción soluble se le realizó un tratamiento térmico en baño maría a 80°C durante 5 minutos y se centrifugó (15 min, 20 000g) para separar las proteínas de *E. coli* precipitadas.

2.4 Análisis por electroforesis

Para los análisis de tamaño molecular y para la detección por Western blot de la proteína, las muestras fueron analizadas en geles desnaturalizantes (SDS) al 12.5%, en gradiente de 4-20% y geles no desnaturalizantes (nativos) 10% (Anexo 6). Los geles desnaturalizantes se tiñeron con Coomassie R250 (BioRad) o Sypro-Ruby (Molecular Probes). Los geles nativos fueron teñidos con Coomassie o tratados para medir la actividad de ADH en zimogramas. Como estándar se utilizaron 10 µg/ml de ADH de *Saccharomyces cerevisiae* (Sigma). Se utilizaron marcadores de peso molecular de proteínas para los geles desnaturalizantes (Bench Marck Protein, Invitrogen) y otro para los geles

nativos (Amersham, Bioscience) para la estimación del tamaño molecular de la proteína.

2.5 Western blot

Los geles desnaturalizantes en gradiente de poliacrilamida de 4-20% se transfirieron a membranas de nitrocelulosa Hybond-C (Amersham), en una cámara horizontal Semy-Dry Trans-blot (BioRad). Se utilizó un anticuerpo primario policlonal contra ADH de *Saccharomyces cerevisiae* producido en conejo (rabbit anti-ADH, Rockland Immunochemicals, USA) y un anticuerpo secundario anti IgG de conejo conjugado con fosfatasa-alcalina (goat anti-rabbit IgG, Sigma). La detección de la proteína se realizó colorimétricamente al incubar con *p*-nitro azul tetrazolium y sodio-5-bromo-4-cloro-3-indol fosfato (NBT y BCIP, Amersham Biosciences) (Anexo 7). El análisis de las membranas y de los geles se llevó acabo en un foto-documentador Gel-Doc 2000 (BioRad) y el software Quantity One™ versión 4.5 (BioRad).

2.6 Zimogramas

La mezcla para detectar actividad enzimática a través de zimogramas en geles nativos de acrilamida consistió en incubar el gel en 50 mM Tris-HCl pH 6, 0.02 mg/mL de metasulfato de fenacina, 0.3 mg/mL de *p*-nitro azul de tetrazolium (NBT, Amersham Biosciences), 0.5 mg/mL de NAD (nicotin-adenin-dinucleotido, Fluka) y 0.8 mL de alcohol etílico. El gel se incubó a 40°C durante 20 minutos y la aparición de la banda de proteína con actividad ADH se documento en un foto-documentador Gel-Doc 2000 (BioRad).

2.7 Purificación

2.7.1 Cromatografía de afinidad con resina de níquel (Ni-NTA, Invitrogen)

El extracto crudo se incubó con resina de níquel y se dejó en agitación durante 3 horas a 4°C para permitir la unión de His-Tag de la proteína con la resina de níquel. Posteriormente se dejó asentar la resina, se retiró el sobrenadante, y se lavó 5 veces con el buffer de lavado. La proteína unida a la resina se recuperó en buffer de elución agitando durante 12 horas a 4°C, subsecuentemente se dejó asentar la resina y se eluyó el buffer (Anexo 8). Las fracciones colectadas se analizaron por medio de SDS-PAGE. La proteína recuperada se ultra-dializó contra buffer de 10 mM Tris-HCl pH 7.5 en celdas con agitación Amicon (Millipore) con membranas de ultrafiltración (Ultracel YM-10, Millipore), por 3 horas.

2.7.2 Cromatografía de filtración en gel

El extracto crudo se cargó en una columna HiPrep 16/60 Sephacryl S-100 HR (Amersham Bioscience); conectada a un Fast Protein Liquid Chromatography system (ÄKTA FPLC UPC-900, Amersham Pharmacia Biotech), la proteína se eluyó en buffer 0.5 M Na₂HPO₄, 0.15 M NaCl, a un pH de 7.2 con un flujo de 1 ml/min y se colectó en fracciones de 3 ml.

Las fracciones se analizaron por SDS-PAGE, utilizando geles de poliacrilamida al 12.5% teñidos con Sypro-Ruby (Molecular Probes). Se concentraron las fracciones y se resuspendieron en 10 mM de Tris-HCl pH 5.5. La concentración de la proteína (Anexo 9) se determinó por el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951).

2.8 Ensayo enzimático

El ensayo enzimático se realizó por el método de Kagi y Vallee, (1960) que consiste en el monitoreo del cambio de absorbancia dependiente de la reducción del cofactor NAD^+ a NADH a 340 nm para ello se utilizó un espectrofotómetro Cary Bio 50 (Varian), con un porta celda de temperatura controlada, y el software Kinetics v3 (Varian). La reacción se consistió en 1 ml de mezcla con 100 mM de Tris-HCl pH 5, 1 mM de NAD^+ , 0.5 mM de Zinc (ZnSO_4) y 0.7 M de etanol. Se calculó la actividad específica a través de la comparación de pendientes entre un blanco (compuesto por todas las soluciones antes mencionadas excepto la enzima) y el ensayo de la proteína purificada. Los parámetros de cinética se calcularon a partir de la ecuación de Michaelis-Menten utilizando el software KaleidaGraph v4.0 (Synergy Software).

2.8.1 Determinación de temperatura pH óptimos y termoestabilidad

La temperatura óptima se determinó en presencia de 100 mM Tris-HCL, pH 5 por la reacción de oxidación de etanol al monitorear la actividad de la enzima por conversión del cofactor reducido (NADH), en un rango de temperatura de 25 a 90°C. El pH óptimo se determinó al monitorear la actividad enzimática con la temperatura óptima con un rango de pH 2 a 8. La termoestabilidad de la enzima ADH1316 se determinó midiendo la actividad residual (oxidación de etanol, con el ensayo estándar) después de incubar la enzima a 90°C durante tres horas.

3. Resultados y discusión

3.1 Análisis de secuencia

De la base de datos de la secuenciación del genoma de *Thermoplasma acidophilum*, se identificaron dos marcos de lectura (*ORF*) cuyas secuencias presentan homología con la alcohol deshidrogenasa (ADH) denominados *Ta0841* y *Ta1316*. Se realizó un análisis comparativo de las secuencias de aminoácidos contra otras ADHs filogenéticamente cercanas (Figura 1). El análisis muestra una identidad de 50% entre *Ta0841* y *Ta1316*, pero varía de 24-75% cuando son comparadas contra otras ADHs. Los sitios canónicos de unión a NAD y de unión a zinc se muestran en la Figura 1. Las secuencias analizadas conservan el sitio de unión a NAD (G-(X)-G-X-(X)-G (Kalberg y Persson, 2006) a lo largo de la posición 171-177. Excepto por la segunda Glicina en *Ta0841* sustituida por una Serina (S-173). Los sitios de unión a zinc tanto catalíticos como estructurales están conservados en la secuencia de *Ta1316*, no así en *Ta0841*, en la que ninguno de los sitios catalíticos de unión a zinc (Cys38, His60 y Cys146) están conservados. Además de estos, uno de los sitios estructurales de zinc (Cys90) también es diferente; estos cambios en la secuencia podrían estar influenciando la actividad de la enzima, como Bogin y colaboradores (1997) observaron; al mutar los tres sitios catalíticos de zinc (Cys37, His59 y Asp150) en la ADH de *Thermoanaerobium brokii* la actividad de la enzima era nula. Por sus características de secuencia *Ta0841* ADH puede clasificarse filogenéticamente dentro de las ADH de cadena media dependiente de NAD(P)⁺. Basado en las características de la secuencia de *Ta1316* ADH

también se logró clasificar dentro de las ADH de cadena media dependiente de NAD⁺ y de zinc.

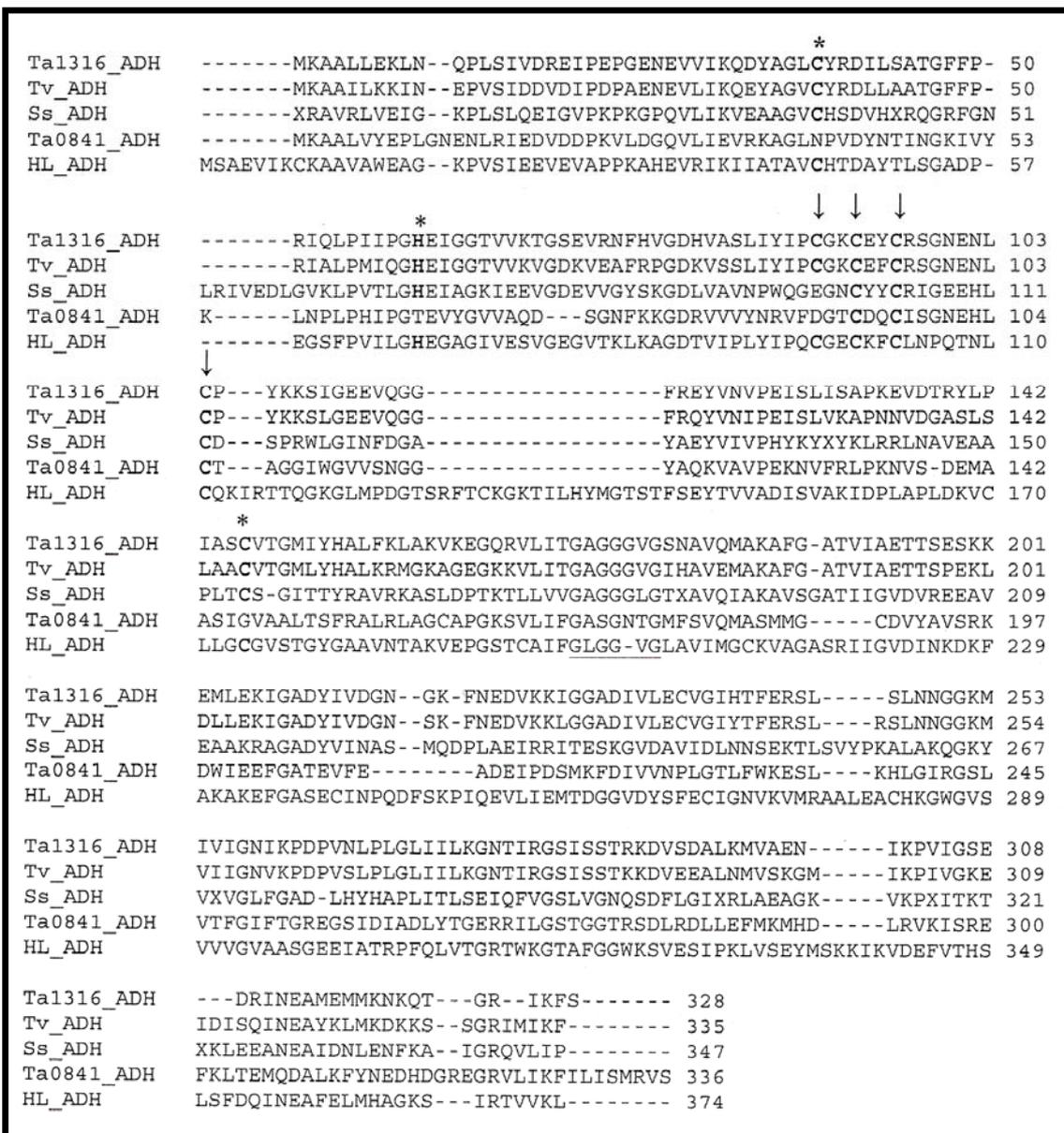


Figura 1. Alineamiento con el programa ClustalW de las secuencias de ADH mostrando los sitios de unión a zinc y a NAD. En negrita y resaltado con * se muestran los residuos involucrados en los sitios catalíticos de unión a zinc; con ↓ se muestran los residuos estructurales de unión a zinc; y subrayado se muestra el sitio de unión a NAD. Ta1316_ADH, *Thermoplasma acidophilum*; Tv_ADH, *Thermoplasma volcanium*; Ss_ADH, *Sulfolobus solfataricus*; Ta0841_ADH, *Thermoplasma acidophilum*; y HL_ADH, Horse Liver ADH.

3.2 Clonación y expresión de Ta0841 y Ta1316

El marco de lectura (*ORF*) de Ta0841 comprende 1011 pb y codifica una proteína de 336 aminoácidos. El *ORF* de Ta1316 comprende 987 pb y codifica una proteína de 328 aminoácidos. En la Figura 2A se observan los fragmentos nucleotídicos del tamaño esperado (aproximadamente 1000 pb) en pares de bases para cada uno de los genes amplificados.

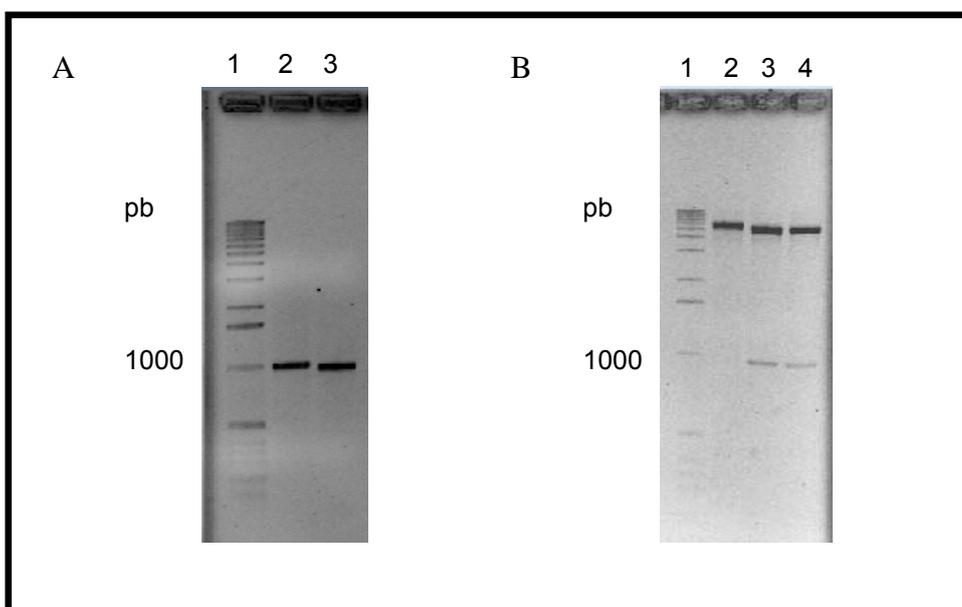


Figura 2. A) Amplificación por PCR de los genes Ta0841 y Ta1316 de *Thermoplasma acidophilum*. Carril 1) marcador de longitud 1 kbp; carril 2) Ta1316 (987 pb); carril 3) Ta0841 (1011 pb). B) Análisis por restricción de clonas. Carril 1) marcador de longitud 1 kbp; carril 2) control (-) pET28a+; carril 3) clona positiva para la construcción pET28+Ta1316; carril 4) clona positiva para la construcción pET28+Ta0841.

El vector de expresión seleccionado fue pET28a+, por ser en conjunto con *E. coli* (BL21pLysS) un excelente sistema para la expresión de proteínas recombinantes. A la construcción diseñada se adicionó una secuencia que codifica para 6 histidinas (*tag*) en la región C-terminal. En la figura 2B se muestra el análisis de restricción de una clona positiva de cada una de las

construcciones. Se observa que el tamaño de los insertos liberados corresponde al tamaño esperado (aproximadamente 1000 pb).

Los análisis de secuenciación de los productos de PCR clonados en el vector de expresión (pET28a+) corroboraron que las secuencias conservan el 100% de identidad con las secuencias de los *ORF* reportadas en la base de datos (NCBI).

3.3 Expresión de las proteínas recombinantes

Al determinar las condiciones óptimas de expresión se obtuvo que la temperatura óptima de crecimiento es 37°C y 8 horas de cultivo después de la inducción con IPTG con una densidad óptica de 0.6.

En las figuras 3A y B se muestra el análisis en geles de acrilamida de los ensayos de expresión. En ellos se observa la acumulación progresiva de las proteínas recombinantes conforme avanza el tiempo de muestreo. El peso molecular calculado de las proteínas es de 36.48 kDa para Ta0841 ADH y de 36.01 kDa para Ta1316 ADH.

Se obtuvo una expresión como se muestra en la figura 3A y B, al obtener una banda mayoritaria correspondiente al tamaño teóricamente calculado (36 kDa) para los dos casos. Por análisis densitométricos obtuvimos que la producción del extracto total de Ta0841 ADH fue aproximadamente 45% y de Ta1316 ADH fue de 51%. La cantidad de proteína producida fue de 13.18 mg/L para Ta0841 y de 12.45 mg/L para Ta1316.

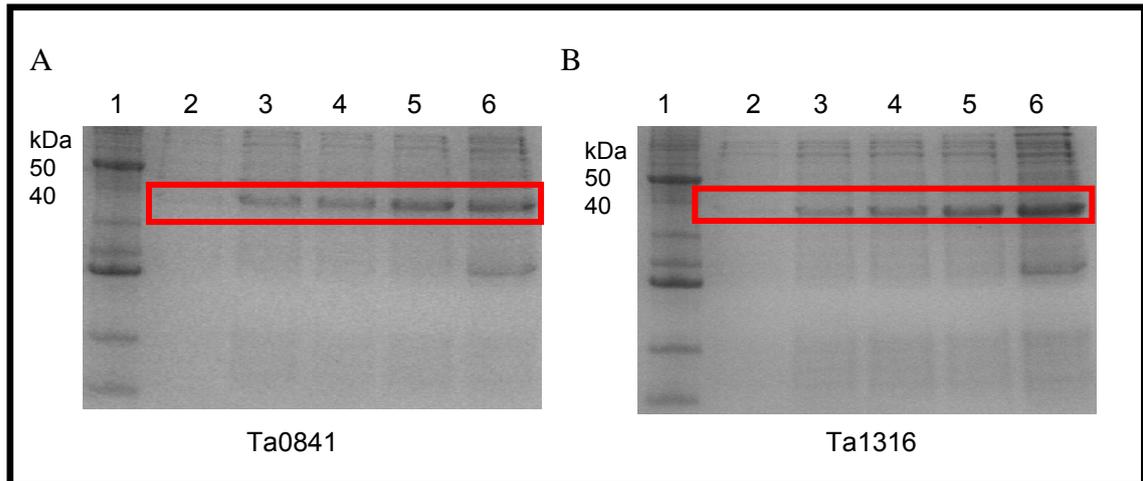


Figura 3. Ensayos de expresión de: A) Ta0841 ADH. Carril 1) marcador de peso molecular; carril 2) previo a inducción; 3) 2 hrs. de inducción; carril 4) 4 hrs. de inducción; carril 5) 8 hrs. de inducción; carril 6) 12 hrs. de inducción. B) Ta1316 ADH. Carril 1) marcador de peso molecular; carril 2) previo a inducción; 3) 2 hrs. de inducción; carril 4) 4 hrs. de inducción; carril 5) 8 hrs. de inducción; carril 6) 12 hrs. de inducción.

3.4 Purificación

Las fracciones de las proteínas purificadas se confirmaron en geles de acrilamida desnaturalizantes al 12.5%. A pesar de que se logró estandarizar la purificación con el método de cromatografía de afinidad a níquel, solo fue posible aislar la proteína Ta0841 ADH por este método. Se obtuvo por consiguiente un 95% de pureza, y se recuperó un total de 2.7 mg/ml (Figura 4A).

La purificación de Ta1316 ADH se realizó por columna de filtración por gel. De esta manera logramos obtener 1.5 mg/ml con un porcentaje de pureza del 97% (Figura 4B).

Con los dos métodos utilizados se logró la purificación eficiente de ambas proteínas recombinantes.

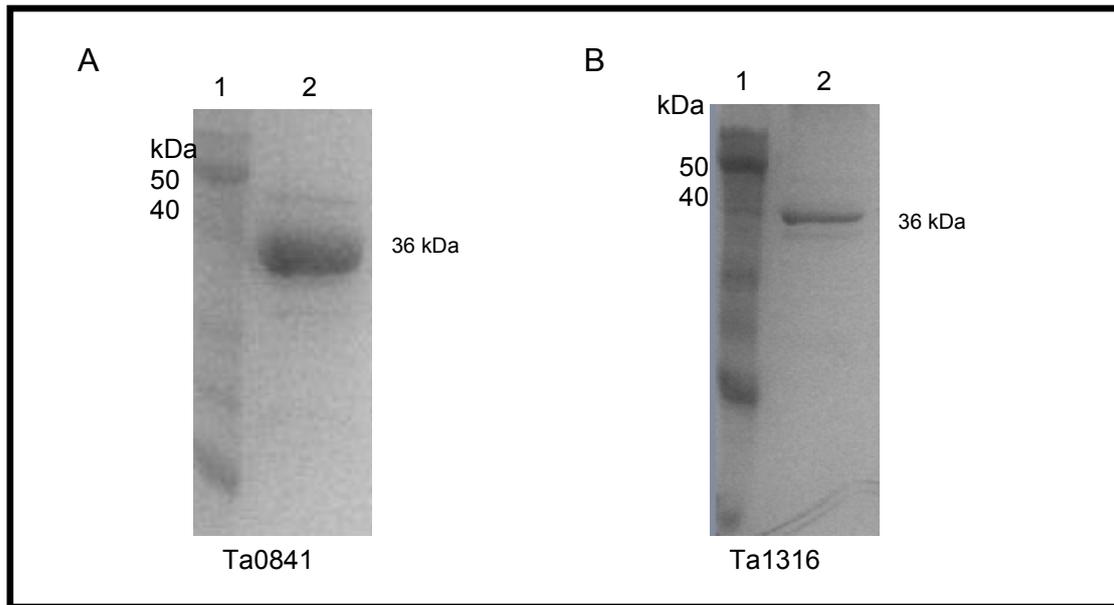


Figura 4. (A) Purificación por cromatografía de afinidad de la proteína recombinante Ta0841 ADH. Carril 1) Marcador de peso molecular; carril 2) proteína Ta0841 ADH purificada. (B) Purificación por cromatografía de filtración en gel de Ta1316 ADH. Carril 1) marcador de peso molecular; carril 2) proteína Ta1316 ADH purificada.

3.5 Análisis por electroforesis

En el análisis por electroforesis desnaturante observamos el estado monomérico de ambas proteínas (Ta0841 y Ta1316 ADHs), se muestran bandas con un peso aproximado de 38 kDa, debido a la presencia de las 6 histidinas (His-Tag) en la región C-terminal de las proteínas (Figura 4 A y B).

Al analizar por electroforesis nativa se observa una banda de tamaño molecular de aproximadamente 140 kDa (Figura 5) lo que sugiere que las proteínas recombinantes tienen un estado conformacional homotetramérico. Esta tendencia a formar oligómeros se ha observado ya en otras ADHs termoestables (e.g. AdhA de *Picrophilus torridus*) (Hess y Antranikian, 2008). Algunos estudios proveen evidencia de que el estado oligomérico es un mecanismo eficiente para estabilizar proteínas que se encuentran bajo

condiciones hostiles como altas temperaturas (Villeret *et al.*, 1998) o altas concentraciones de solutos (Ceci *et al.*, 2005).

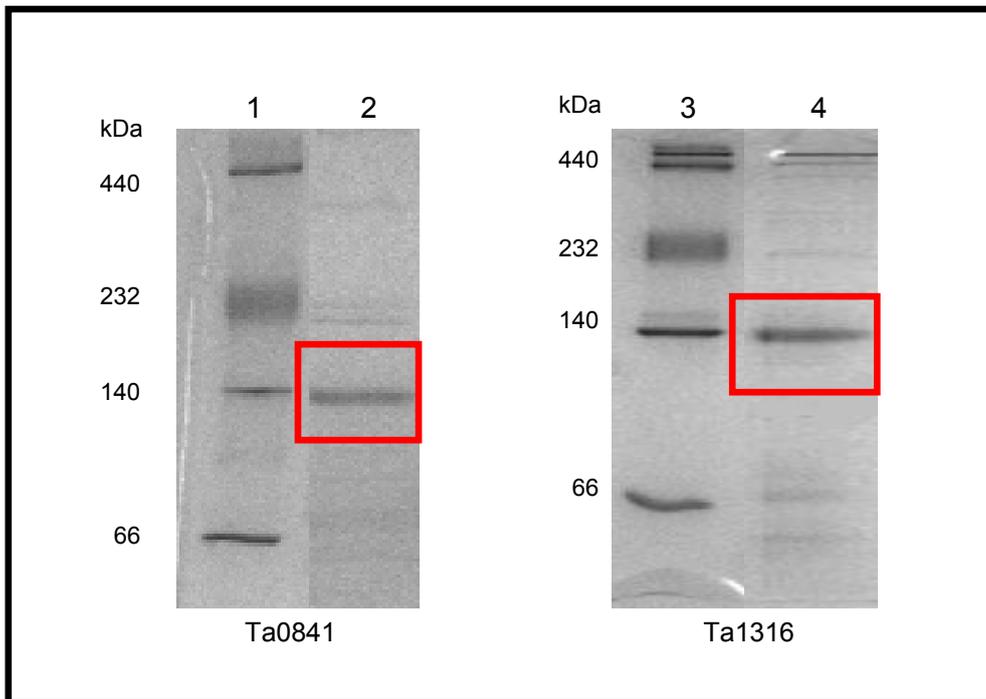


Figura 5. Gel de electroforesis nativo de las proteínas recombinantes Ta0841 y Ta1316 ADHs purificadas. Carril 1) y 3) marcador de peso molecular; carril 2) Ta0841 ADH; carril 3) Ta1316 ADH.

3.6 Western blot

Se confirmó que las proteínas expresadas fueran ADHs mediante la detección por Western blot contra-ADH, se observó reacción cruzada con las proteínas recombinantes (Figura 6).

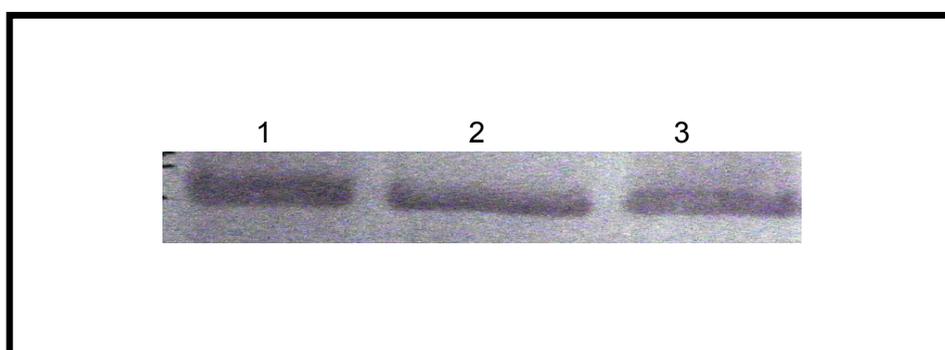


Figura 6. Análisis por Western blot de las proteínas recombinantes; carril 1) control positivo ADH de *Saccharomyces cerevisiae*; carril 2) Ta1316 ADH; carril 3) Ta0841 ADH.

3.7 Zimogramas

Se analizó la actividad enzimática de las proteínas Ta0841 ADH y Ta1316 ADH por medio de zimogramas en geles nativos de acrilamida.

Ta0841 ADH no presentó actividad, en contraste, se detectó actividad en la banda correspondiente al homotetramero (140 kDa) de Ta1316 (Figura 7). Con estos resultados se confirmó que la conformación activa homotetramérica de la proteína Ta1316 es de naturaleza alcohol deshidrogenasa.

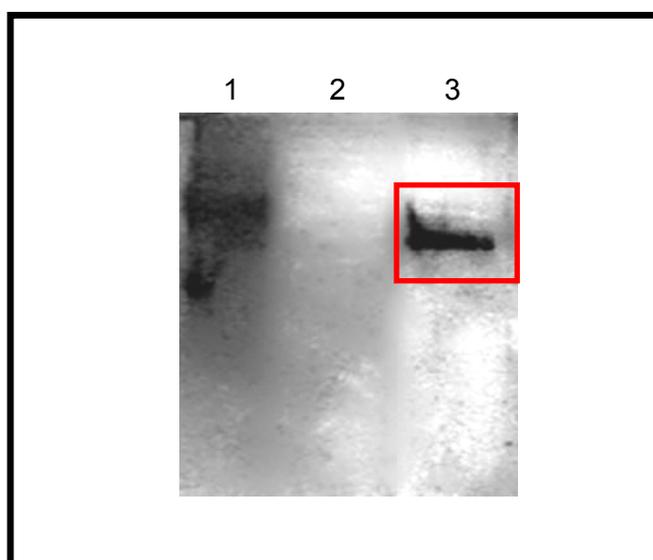


Figura 7. Zimograma; carril 1) control positivo ADH de *Saccharomyces cerevisiae*; carril 2) Ta0841 ADH; carril 3) Ta1316 ADH.

3.8 Caracterización enzimática

Se analizaron las condiciones óptimas (temperatura y pH) para la actividad de las proteínas recombinantes, así como su afinidad por los cofactores NAD^+ y NADP^+ , diferentes sustratos (alcoholes), influencia de iones Zinc^{2+} y termoestabilidad.

La actividad enzimática se analizó utilizando tanto extractos totales como las proteínas purificadas.

No se detectó actividad para la proteína Ta0841. Es importante mencionar que los ensayos enzimáticos para esta se realizaron en presencia de ambos cofactores NAD y NADP, en presencia y ausencia de zinc y los diferentes sustratos; como se discutió antes, la ausencia de actividad de Ta0841 podría estar dada por los cambios de aminoácidos de los sitios catalíticos y estructurales de zinc (Figura 1). Cabe mencionar que la naturaleza de Ta0841 queda aún por ser determinada, en su posible participación en el proceso enzimático inverso (acetaldehído ↔ etanol).

Así se enfocó al estudio de Ta1316. Encontramos que para Ta1316, el cofactor preferido es NAD⁺ contra NADP⁺. La proteína recombinante muestra una actividad máxima a una temperatura de 75°C. Al incrementar la temperatura a 80, 85 y 90°C la enzima muestra un ligero decremento de actividad de 25 % (Figura 8).

Los estudios dependientes de temperatura muestran que, Ta1316 ADH posee actividad enzimática en un rango de 65 a 90°C, y máxima actividad a 75°C propio de enzimas provenientes de organismos termofílicos. La conservación del 80% de actividad a 90°C es de interés pues potencialmente podría ser un buen candidato en los procesos de biocatálisis en la industria (Rella *et al.*, 1987).

Como otras enzimas termófilas Ta1316 presenta actividad máxima a temperaturas por encima de la temperatura de crecimiento del microorganismo del cual proviene. Esta característica ha sido observada en varias ADH termofílicas ya caracterizadas (Tabla 2): las ADHs de *Sulfolobus solfataricus* y

Sulfolobus sp (Cannio *et al.*, 1996), cuya temperatura óptima es de 78°C; la ADH de *Rhodococcus erythropolis* (Abokitse y Hummel, 2003), con actividad máxima a 50°C; y la ADH de *Picrophilus torridus* (Hess y Antranikian, 2008) que presenta una temperatura óptima de 83°C. Ta1316 presenta resistencia a altas temperaturas (termoestabilidad); se observó que al elevar la temperatura de reacción (90°C) mantiene cerca del 80% de actividad.

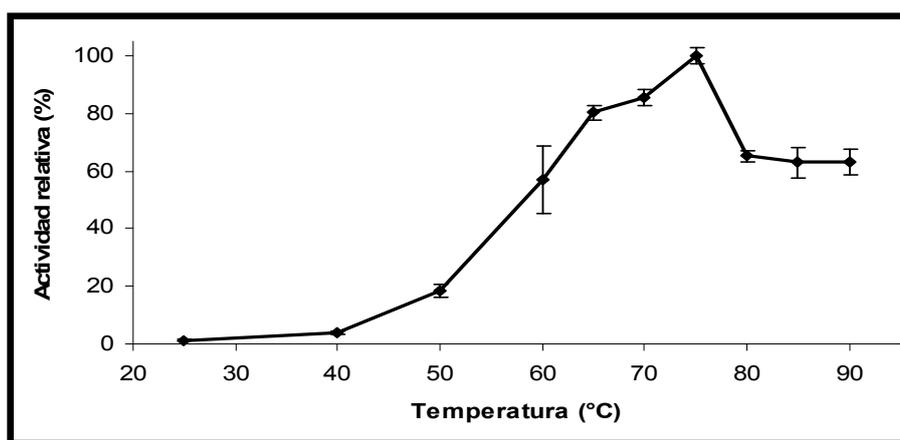


Figura 8. Dependencia a la temperatura de Ta1316 ADH.

Otra característica que la hace interesante, es que la actividad enzimática máxima de ADH Ta1316 es a pH de 5.0, y tiende a la inactivación cuando es incubada en soluciones con pHs básicos (Figura 9).

Esto se ha documentado para la mayoría de las proteínas estudiadas de *T. acidophilum*. El pH del citosol en *T. acidophilum* es de 5.5 (Hsung y Haug, 1975) y las proteínas hasta ahora estudiadas presentan actividad cerca de ese pH (e.g. VAT, TAA43) (Pamnani *et al.*, 1997; Santos *et al.*, 2004). Es importante hacer notar que las enzimas ADH antes descritas presentan actividad en rangos más básicos (pH 10, 6 y 8 respectivamente, (Tabla 2).

De manera sorprendente, la ADH de *Picrophilus torridus* (uno de los organismos más acidófilos, crecimiento celular a pH 0.7), solo mantiene 10% de actividad en un rango de pH 3-6.

Tabla 2. Características bioquímicas de ADHs de origen diferente

Origen	Actividad específica Umg ⁻¹	pH óptimo	T°C óptima	K _M mM	V _{max} mMs ⁻¹	Conformación
<i>T. acidophilum</i> ^a (Ta1316 ADH)	628.7	5.0	75	5.7	4.3x10 ⁻⁴	Tetrámero
<i>P. torridus</i> ^{a,1}	225.0	8.0	83	0.056	ND	Dodecámero
<i>S. solfataricus</i> ^{a,2}	10.1	10.0	78	0.260	ND	Tetrámero
<i>S. sp</i> (RC3) ^{a,2}	2.88	10.0	78	0.0172	ND	Tetrámero
<i>N. pharaonis</i> ^{a,3}	ND	9.0	70	1.3	2.7x10 ⁻⁵	ND
<i>R. erythropolis</i> ^{b,4}	846	6.0	50	ND	ND	ND
<i>Z. mobilis</i> ADHI ^{b,5}	93	9.5	37	4.8	ND	ND
<i>Z. mobilis</i> ADHII ^{b,5}	470	6.5	37	1.3	ND	ND
Hígado de caballo ^{c,6}	ND	6.1	37	118	ND	Dímero

^aArchaea; ^b Bacteria; ^cEukarya; ND, No determinado; ¹(Hess y Antranikian, 2008), ²(Cannio *et al.*, 1996), ³(Cao *et al.*, 2008), ⁴(Abokitse y Hummel, 2003), ⁵(Neale *et al.*, 1986), ⁶(Andersson y Mosbach, 1982; Pietruszko, 1982).

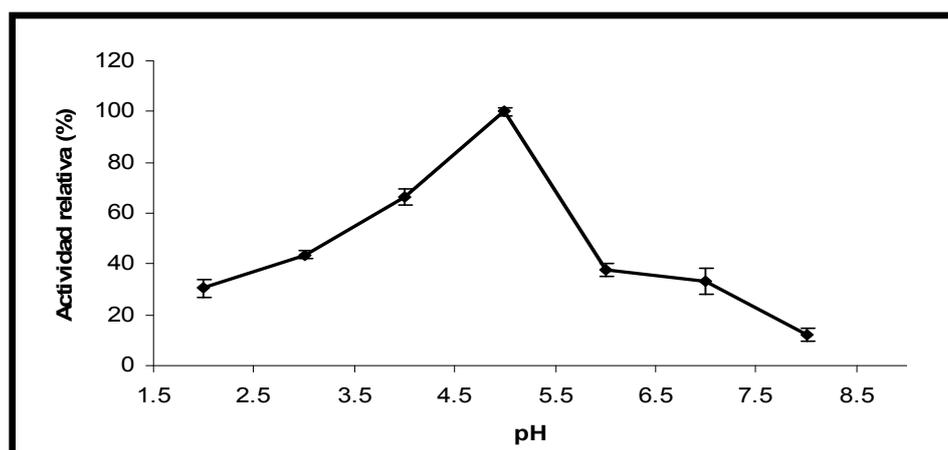


Figura 9. Determinación de pH óptimo de Ta1316.

La actividad específica obtenida a temperatura y pH óptimos fue de 628.7 U/mg. En la tabla 3 se muestra el rendimiento y actividad específica de Ta1316

comparada contra ADHs filogenéticamente cercanas ya caracterizadas y en la tabla 3 su actividad en extractos totales y proteína pura.

Tabla 3. Rendimiento y actividad alcohol deshidrogenasa de Ta1316 ADH

Muestra	Proteína total mg/ml	Actividad total U/ml	Actividad específica U/mg
Extracto total	52	297	17.6
Proteína purificada	1.5	943	628.7

La ADH Ta1316 muestra termoestabilidad (Figura 10). Después de incubarla a 90°C por un periodo de 180 minutos la actividad disminuye a niveles no detectables gradualmente. Después de 50 minutos de incubación, conserva aún 50% de actividad residual. En otros ensayos la actividad de la enzima solo disminuye 15% después de permanecer 24 horas a temperatura ambiente.

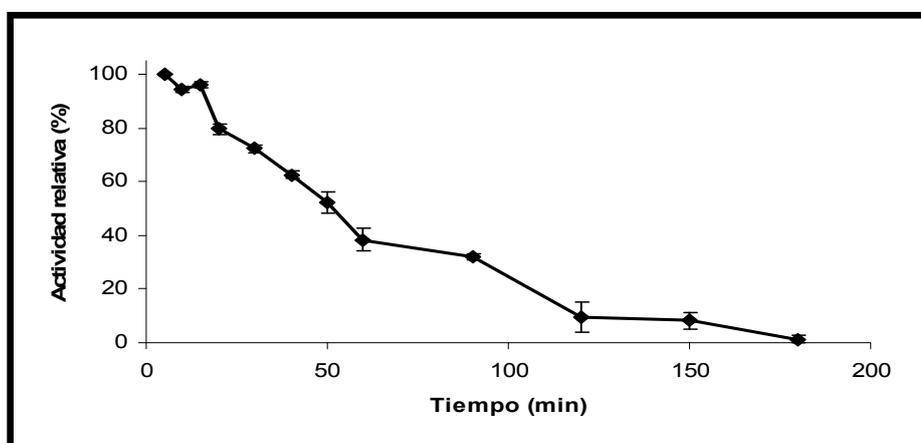


Figura 10. Termoestabilidad de Ta1316 a 90°C

La enzima presenta afinidad específica para el etanol como sustrato. Con otros sustratos como 2-propanol y 1-butanol, conserva cerca del 70% de su actividad, mientras que con otros sustratos como metanol, 1-pentanol y 1-hexanol, baja más del 50% su actividad (Tabla 4).

Tabla 4. Actividad oxidativa de Ta1316 ADH con diferentes sustratos.

Sustrato	Actividad relativa %
Etanol	100
2-propanol	73.56
1-butanol	67.7
Metanol	49.9
1-pentanol	19.1
1-hexanol	15.3
2-pentanol	5.7

Se analizó la dependencia de metales para la actividad de Ta1316 (Tabla 5). Se observó que solamente el zinc influyó en la actividad contra otros iones divalentes (e.g. Mg²⁺). Una concentración de 0.5 mM de Zn²⁺ fue necesaria para alcanzar una actividad máxima y concentraciones más altas (hasta 2 mM) produjeron inhibición. De manera similar la ADH de *Nantronomonas pharaonis* (Cao *et al.*, 2008), concentraciones arriba de 0.5 mM de zinc²⁺ producen inhibición de la actividad catalítica de la enzima en la reacción de oxidación de etanol.

Tabla 5. Efecto de iones Zn²⁺ sobre la actividad de Ta1316

mM Zn²⁺	Actividad relativa %
0	25
0.5	100
1.0	65
1.5	46
2.0	12
3.0	5
4.0	2

Se calcularon los parámetros cinéticos en base a las condiciones de actividad enzimática óptima (sustrato, etanol; cofactor, NAD⁺; temperatura, 75°C; y pH 5.0, Figura 11). Los valores de las constantes cinéticas K_m y V_{max} , fueron de 5.7×10^{-2} M y de 4.3×10^{-4} mM s⁻¹ respectivamente, con una k_{cat} de 7.6 s⁻¹ y una eficiencia catalítica (k_{cat}/K_m) de 133 s⁻¹ M⁻¹.

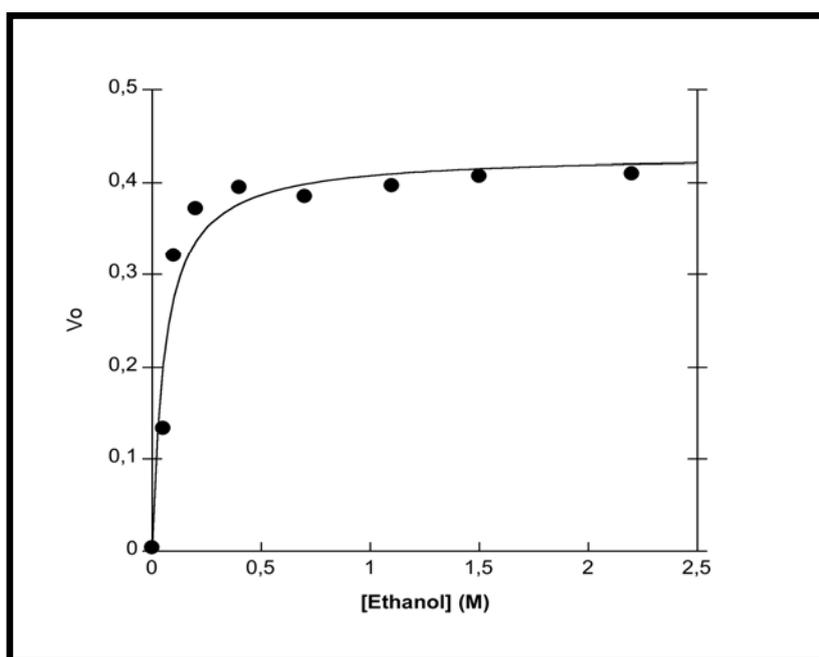


Figura 11. Representación de datos cinéticos de Ta1316 de Michaelis-Menten donde se muestra V_0 (rangos iniciales de reacción mM s⁻¹) contra concentración de etanol, para determinar los parámetros cinéticos K_M y V_{max} . ($R^2=0.947$)

Estos resultados confirman que la proteína recombinante Ta1316 ADH es una enzima alcohol deshidrogenasa, termoresistente en el proceso de biocatálisis de etanol a acetaldehído.

Este trabajo experimental fue aceptado para su publicación en la revista *Molecular Biotechnology*. DOI 10.1007/s12033-008-9130-z.

Heterologous Expression and Characterization of an Alcohol Dehydrogenase from the Archeon *Thermoplasma acidophilum*

Erika Nahomy Marino-Marmolejo ·
Antonio De León-Rodríguez ·
Ana Paulina Barba de la Rosa ·
Leticia Santos

© Humana Press 2008

Abstract Analysis of the *Thermoplasma acidophilum* DSM 1728 genome identified two putative alcohol dehydrogenase (ADH) open reading frames showing 50.4% identity against each other. The corresponding genes *Ta0841* and *Ta1316* encode proteins of 336 and 328 amino acids with molecular masses of 36.48 and 36.01 kDa, respectively. The genes were expressed in *Escherichia coli* and the recombinant enzymes were functionally assessed for activity. Throughout the study only *Ta1316* ADH resulted active in the oxidative reaction in the pH range 2–8 (optimal pH 5.0) and temperatures from 25 to 90°C (optimal 75°C). This ADH catalyzes the oxidation of several alcohols such as ethanol, methanol, 2-propanol, butanol, and pentanol during the reduction of the cofactor NAD⁺. The highest activity was found in the presence of ethanol producing optically pure acetaldehyde. The specific enzyme activity of the purified *Ta1316* ADH with ethanol as a substrate in the optimal conditions was 628.7 U/mg.

Keywords Alcohol dehydrogenase ·
Thermoplasma acidophilum · Thermal stability ·
Archaea · Oxidative reaction

Abbreviations

ADH Alcohol dehydrogenase
Orf Open reading frame
NAD Nicotin adenine dinucleotide

E. N. Marino-Marmolejo · A. De León-Rodríguez ·
A. P. B. de la Rosa · L. Santos (✉)
Division of Molecular Biology, Institute for Scientific and
Technological Research of San Luis Potosí (IPICYT), Camino a
la Presa San Jose 2055, Lomas 4a Seccion, CP 78216 San Luis
Potosi, Mexico
e-mail: lsantos@ipicyt.edu.mx

Introduction

Thermoacidophilic organisms are a promising source of enzymes that possess unique features to survive in extreme conditions with the advantage of having a great potential in biotechnological applications. Moreover, the elucidation of key mechanisms of action, regulatory, and evolutionary events of this type of enzymes is currently under extensive investigation.

Thermoplasma acidophilum is a thermo-acidophilic microorganism that belongs to the kingdom archaea [1, 2] and grows at a strict temperature of 58 to 60°C and pH 1.5–2.0 [3]. Due to its characteristics *T. acidophilum* has been used as a model for studying the key mechanisms of action of orthologous proteins present in higher organisms as well as studies focused on potentially stable enzymes for industrial processes. Annotation of the sequenced genome of *T. acidophilum* [4] revealed two potential alcohol dehydrogenases (ADHs) open reading frames (*orfs*): *Ta0841* and *Ta1316* (NCBI accession numbers: NP344301 and CAC12437).

ADHs are enzymes widely distributed in nature and they function in an important number of mechanisms such as detoxification and metabolism of ethanol and other alcohols and the catalysis of the cofactor-dependent oxidation for primary and secondary alcohols to their corresponding aldehydes and ketones [5]. Based on cofactor specificity they are classified as: (1) nicotin adenine dinucleotide [NAD (P)], (2) pyrrolo-quinoline quinone, (3) heme or cofactor F₄₂₀, and (4) flavin adenine dinucleotide. The NAD⁺-dependent ADHs are subsequently subdivided into three groups: zinc dependent, short chain, and iron activated [6, 7]. The biotechnological significance of looking for stable ADHs is mainly due to their participation in the stereo specific organic synthesis [8, 9] in food,

4. Conclusiones

- Ta0841 ADH no mostró actividad con los ensayos de oxidación de sustrato realizados, es probable que sea debido a los cambios de aminoácidos que presenta en los sitios de unión a zinc, observado en otras ADHs descritas. A pesar de sus características de secuencia no se puede clasificar como una ADH-NAD(P)-Zn²⁺ dependiente.
- Ta1316 ADH mostró actividad máxima en presencia de etanol y NAD⁺, con una temperatura óptima de 75°C y pH de 5.0.
- Estas características clasifican a Ta1316 ADH como una enzima alcohol deshidrogenasa de cadena media dependiente de zinc.
- La ADH Ta1316 es termoestable (90°C). Retiene 50% de su actividad a lo largo de 50 minutos, lo que la convierte en un potencial candidato para procesos de biocatálisis.

5. Perspectivas

- Determinar la naturaleza enzimática de Ta0841 a través de la posible participación en vías metabólicas alternas.
- Analizar la reacción de conversión reversa (acetaldehído ↔ etanol) para ambas ADHs y comparar los parámetros cinéticos, y la determinación específica de la reacción que realiza en *T. acidophilum*.

6. Referencias

- Abokitse, K y Hummel, W (2003). Cloning, sequence analysis, and heterologous expression of the gene encoding a (S)-specific alcohol dehydrogenase from *Rhodococcus erythropolis* DSM 43297. *Applied Microbiology and Biotechnology* 62:380-386.
- Andersson, L y Mosbach, K (1982). Alcohol dehydrogenase from horse liver by affinity chromatography. *Methods Enzymol* 89 Pt D:435-445.
- Bogin, O, Peretz, M y Burstein, Y (1997). *Thermoanaerobacter brockii* alcohol dehydrogenase: characterization of the active site metal and its ligand amino acids. *Protein Sci* 6:450-458.
- Branden, CI, Eklund, H, Nordstrom, B, Boiwe, T, Soderlund, G, Zeppezauer, E, Ohlsson, I y Akeson, A (1973). Structure of liver alcohol dehydrogenase at 2.9-angstrom resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 70:2439-2442.
- Cannio, R, Fiorentino, G, Carpinelli, P, Rossi, M y Bartolucci, S (1996). Cloning and overexpression in *Escherichia coli* of the genes encoding NAD-dependent alcohol dehydrogenase from two *Sulfolobus* species. *J Bacteriol* 178:301-305.
- Cao, Y, Liao, L, Xu, XW, Oren, A, Wang, C, Zhu, XF y Wu, M (2008). Characterization of alcohol dehydrogenase from the haloalkaliphilic archaeon *Natronomonas pharaonis*. *Extremophiles* 12:471-476.
- Ceci, P, Ilari, A, Falvo, E, Giangiacomo, L y Chiancone, E (2005). Reassessment of protein stability, DNA binding, and protection of *Mycobacterium smegmatis* Dps. *J Biol Chem* 280:34776-34785.
- Egorova, K y Antranikian, G (2005). Industrial relevance of thermophilic Archaea. *Curr Opin Microbiol* 8:649-655.

- Esposito, L, Sica, F, Raia, CA, Giordano, A, Rossi, M, Mazzarella, L y Zagari, A (2002). Crystal structure of the alcohol dehydrogenase from the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* at 1.85 Å resolution. *J Mol Biol* 318:463-477.
- Hammes-Schiffer, S y Benkovic, SJ (2006). Relating protein motion to catalysis. *Annu Rev Biochem* 75:519-541.
- Hess, M y Antranikian, G (2008). Archaeal alcohol dehydrogenase active at increased temperatures and in the presence of organic solvents. *Appl Microbiol Biotechnol* 77:1003-1013.
- Hsung, JC y Haug, A (1975). Intracellular pH of *Thermoplasma acidophila*. *Biochim Biophys Acta* 389:477-482.
- Hummel, W y Kula, MR (1989). Dehydrogenases for the synthesis of chiral compounds. *Eur J Biochem* 184:1-13.
- Inoue, K, Makino, Y y Itoh, N (2005). Purification and characterization of a novel alcohol dehydrogenase from *Leifsonia* sp. strain S749: a promising biocatalyst for an asymmetric hydrogen transfer bioreduction. *Appl Environ Microbiol* 71:3633-3641.
- Kagi, JH y Vallee, BL (1960). The role of zinc in alcohol dehydrogenase. V. The effect of metal-binding agents on the structure of the yeast alcohol dehydrogenase molecule. *J Biol Chem* 235:3188-3192.
- Kalberg, Y y Persson, B (2006). Prediction of coenzyme specificity in dehydrogenases/reductases. A hidden Markov model-based method and its application on complete genomes. *FEBS J* 273:1177-1184.
- Kelly, JM, Drysdale, MR, Sealy-Lewis, HM, Jones, IG y Lockington, RA (1990). Alcohol dehydrogenase III in *Aspergillus nidulans* is anaerobically

- induced and post-transcriptionally regulated. *Mol Gen Genet* 222:323-328.
- Littlechild, JA, Guy, JE y Isupov, MN (2004). Hyperthermophilic dehydrogenase enzymes. *Biochem Soc Trans* 32:255-258.
- Lowry, OH, Rosebrough, NJ, Farr, AL y Randall, RJ (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275.
- Neale, AD, Scopes, RK, Kelly, JM y Wettenhall, RE (1986). The two alcohol dehydrogenases of *Zymomonas mobilis*. Purification by differential dye ligand chromatography, molecular characterization and physiological roles. *Eur J Biochem* 154:119-124.
- Pamnani, V, Tamura, T, Lupas, A, Peters, J, Cejka, Z, Ashraf, W y Baumeister, W (1997). Cloning, sequencing and expression of VAT, a CDC48/p97 ATPase homologue from the archaeon *Thermoplasma acidophilum*. *FEBS Lett* 404:263-268.
- Patel, R (2004). Biocatalytic synthesis of chiral pharmaceutical intermediates. *Food Technol. Biotechnol.* 42:305-325.
- Persson, B, Krook, M y Jornvall, H (1991). Characteristics of short-chain alcohol dehydrogenases and related enzymes. *Eur J Biochem* 200:537-543.
- Pietruszko, R (1982). Alcohol dehydrogenase from horse liver, steroid-active SS isoenzyme. *Methods Enzymol.* 89:429-435.
- Reid, MF y Fewson, CA (1994). Molecular characterization of microbial alcohol dehydrogenases. *Crit Rev Microbiol* 20:13-56.
- Rella, R, Raia, CA, Pensa, M, Pisani, FM, Gambacorta, A, De Rosa, M y Rossi, M (1987). A novel archaeobacterial NAD⁺-dependent alcohol dehydrogenase. Purification and properties. *Eur J Biochem* 167:475-479.

- Rossmann, MG y Argos, P (1981). Protein folding. *Annu Rev Biochem* 50:497-532.
- Ruepp, A, Graml, W, Santos-Martinez, ML, Koretke, KK, Volker, C, Mewes, HW, Frishman, D, Stocker, S, Lupas, AN y Baumeister, W (2000). The genome sequence of the thermoacidophilic scavenger *Thermoplasma acidophilum*. *Nature* 407:508-513.
- Saliola, M, Bellardi, S, Marta, I y Falcone, C (1994). Glucose metabolism and ethanol production in adh multiple and null mutants of *Kluyveromyces lactis*. *Yeast* 10:1133-1140.
- Santos, L, Frickey, T, Peters, J, Baumeister, W, Lupas, A y Zwickl, P (2004). *Thermoplasma acidophilum* TAA43 is an archaeal member of the eukaryotic meiotic branch of AAA ATPases. *Biol Chem* 385:1105-1111.
- Sofer, W y Martin, PF (1987). Analysis of alcohol dehydrogenase gene expression in *Drosophila*. *Annu Rev Genet* 21:203-225.
- Vieille, C y Zeikus, G (1996). Thermozyms: identifying molecular determinants of protein structural and functional stability. *TIBTECH* 14:183-190.
- Vieille, C y Zeikus, GJ (2001). Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiol Mol Biol Rev* 65:1-43.
- Villeret, V, Clantin, B, Tricot, C, Legrain, C, Roovers, M, Stalon, V, Glansdorff, N y Van Beeumen, J (1998). The crystal structure of *Pyrococcus furiosus* ornithine carbamoyltransferase reveals a key role for oligomerization in enzyme stability at extremely high temperatures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:2801-2806.

Anexo 1

Protocolo de limpieza de producto de PCR

Kit Wizard SV Clean-Up System

- Adicionar un volumen igual al volumen del producto de PCR de Membrane Binding Solution.
- Colocar la columna en un tubo colector de 2ml, utilizar una columna para cada reacción de PCR.
- Transferir el producto preparado de producto de PCR a la columna, e incubar por 1 minuto a temperatura ambiente.
- Centrifugar por un minuto a 13000 rpm. Remover la columna y descartar el líquido filtrado, regresar la columna al tubo colector.
- Lavar la columna adicionando 700µl de la Membrana Wash Solution, previamente diluída con etanol al 95%. Centrifugar durante 1 minuto a 13000 rpm, descartar el líquido filtrado. Repetir el lavado con 500µl de la solución y centrifugar durante 5 minutos a 13000 rpm.
- Remover la columna del tubo colector, con cuidado de q no toque el líquido filtrado, descartar el líquido y volver a ensamblar, centrifugar durante 1 minuto a 13000 rpm, para eliminar el resto de etanol.
- Con cuidado transferir la columna a un tubo ependorf de 1.5ml limpio. Adicionar 50µl de agua libre de nucleasas directamente al centro de la

membrana sin que la punta de la pipeta toque la membrana, Incubar a temperatura ambiente por 1 minuto. Centrifugar por 1 minuto a 13000 rpm.

- Descartar la columna y utilizar el DNA o almacenar a -20°C.

Anexo 2

Geles de agarosa al 1%

Agarosa	0.4g
Buffer TAE 1X	40 ml

Bromuro de etidio 100 mg/ml

Bromuro de etidio	100 mg
Agua destilada	100 ml

Anexo 3

Células competentes

Método de RbCl

- Crecer un preinóculo de 5 ml toda la noche
- Inocular 50 ml de medio LB con la cantidad suficiente para alcanzar una densidad óptica (OD) de 0.2.

- Incubar a 37°C durante tres horas, durante las cuales monitorear que la OD llegue a 0.6.
- Reposar en hielo durante 30 min.
- Cosechar las células por centrifugación a 7000 rpm por 10 min a 4°C.
- Resuspender el pellet con solución RF1
- Incubar 30 min en hielo
- Centrifugar por 10 min a 7000 rpm a 4°C.
- Resuspender el pellet en 600 – 1000 µl de solución RF2.
- Alicuotar 100 µl en tubos ependorf, utilizar o almacenar a -70°C.

Soluciones

<u>KAC 1M pH 7.5</u>	<u>10 ml</u>
Acetato de potasio	0.98 g
Agua destilada	10.0 g

Ajustar el pH con ácido acético y esterilizar por filtración

<u>RF1</u>	<u>200ml</u>
RbCl	2.4 g
MnCl ₄ H ₂ O	1.98 g
CaCl ₂	0.30 g
Glicerol	30.0 ml
KAC 1M pH 7.5	6.0 ml
Agua destilada	c.b.p.

Esterilizar en autoclave y adicionar los 6 ml de KAC.

<u>MOPS 0.5 M pH 6.8</u>	<u>5 ml</u>
MOPS	0.052 g
Agua destilada	5.0 ml

Ajustar el pH con NaOH y esterilizar por filtración

<u>RF2</u>	<u>200ml</u>
RbCl	0.24 g
CaCl ₂	2.2 g

Glicerol	30.0 ml
MOPS 0.5M pH 6.8	4.0 ml

Esterilizar en autoclave y agregar 4 ml de MOPS

Anexo 4

Composición de medio LB (Luria bertani, Invitrogen)

LB líquido

Bacto triptona	10 g/L
Cloruro de sodio	10 g/L
Extracto de levadura	5 g/L

LB sólido

Bacto triptona	10 g/L
Cloruro de sodio	10 g/L
Bacto agar	15 g/L
Extracto de levadura	5 g/L

Antibióticos

Solución stock de kanamicina 50 mg/ml

Solución stock de cloramfenicol 50 mg/ml

Anexo 5

Miniprep (QIAprep, Qiagen)

- Crecer un peinoculo de las clonas seleccionadas en 4 ml de medio LB a 37°C toda la noche.
- Cosechar las células por centrifugación.
- Resuspender el pellet en 250 µl de buffer P1
- Adicionar 200 µl de buffer P2 y mezclar por inversión.
- Adicionar 350 µl de buffer N3 y mezclar por inversión.

- Centrifugar por 10 min a 13 000 rpm a 4°C
- Poner el sobrenadante en una columna.
- Centrifugar por 1 min a 13 000 rpm.
- Unir el DNA a la membrana con 500 µl de buffer PB y centrifugar por 1 min a 13 000 rpm.
- Lavar la columna con 750 µl de buffer PE y centrifugar por 1 min descartar el líquido filtrado y centrifugar por 1 min.
- Eluir en un tubo limpio con 50 µl de buffer EB o agua destilada estéril, incubar 1 min y centrifugar.

Anexo 6

Electroforesis de proteínas

SDS-PAGE

<u>Buffer 1.5M Tris-HCl pH 8.8</u>	<u>100ml</u>
Tris base	18.15 g
Agua destilada	c.b.p.

Ajustar pH con HCL

<u>Buffer 0.5M Tris-HCl pH 6.8</u>	<u>100ml</u>
Tris base	6.0 g
Agua destilada	c.b.p.

Ajustar pH con HCl

<u>SDS 10%</u>	<u>10 ml</u>
SDS	1 g
Agua destilada	c.b.p.

<u>PSA 10%</u>	<u>1ml</u>
Persulfato de amonio	0.1 g
Agua destilada	c.b.p.

<u>Buffer de corrida 40X</u>	<u>400 ml</u>
Tris base	48.0 g
Glicina	30.0 g
SDS 10%	160.0 ml
Agua destilada	c.b.p.

<u>Azul de Comassie</u>	<u>50 ml</u>
Azul de Comassie	0.125 g
Metanol	22.50 ml
Ácido acético	22.50 ml
Agua destilada	c.b.p.

<u>Solución de desteñido</u>	<u>500 ml</u>
Ácido acético	25 ml
Metanol	250 ml
Agua destilada	c.b.p.

<u>Buffer de carga (Laemmli)</u>	<u>10 ml</u>
Tris 1M pH 8.8	2.5 ml
Glicerol	2.8 ml
Azul de bromofenol	25.0 mg
SDS 2%	2.0 ml
Agua destilada	c.b.p.

<u>Gel de acrilamida gradiente 5.5</u>	<u>4%</u>	<u>20.0%</u>
Agua destilada	1.65 ml	205 µl
Tris-HCl 1.5M pH 8.8	690 µl	690 µl
Acrilamida bis-acrilamida 30%	365 µl	1.815 ml
SDS 10%	27.5 µl	27.5 µl
PSA	9.2 µl	9.2 µl
TEMED	0.91 µl	1.83 µl

<u>Gel de acrilamida separador</u>	<u>12.5%</u>
Agua destilada	1.32 ml
Tris-HCl 1.5M pH 8.8	1.0 ml
Acrilamida bis-acrilamida 30%	1.6 ml
SDS 10%	40.0 µl
PSA 10 %	40.0 µl
TEMED	2.4 µl

<u>Gel de acrilamida concentrador</u>	<u>4%</u>
Agua destilada	600 µl
Tris-HCl 0.5M pH 6.8	252 µl
Acrilamida bis-acrilamida 30%	132 µl

SDS 10%	10 μ l
PSA 10%	10 μ l
TEMED	1 μ l

<u>Gel de acrilamida Nativo separador</u>	<u>10%</u>
Agua destilada	1.89 ml
Tris-HCl 1.5M pH 8.8	1.0 ml
Acrilamida bis-acrilamida 30%	1.28 ml
EDTA 2mM	40 μ l
PSA 10%	40 μ l
TEMED	2.4 μ l

<u>Gel de acrilamida Nativo concentrador</u>	<u>4%</u>
Agua destilada	600 μ l
Tris-HCl 0.5M pH 6.8	252 μ l
Acrilamida bis-acrilamida 30%	132 μ l
EDTA 2mM	10 μ l
PSA	10 μ l
TEMED	1 μ l

Anexo 7

Western blot

Soluciones

<u>Buffer Towbin (Transferencia)</u>	<u>1l</u>
Tris-base 48 mM	5.8 g
Glicina 39 mM	2.9 g
Metanol 20%	200 ml
SDS 0.037%	(SDS 10%) 3.7 ml

<u>Rojo de Ponceau</u>	<u>10 ml</u>
Ponceau xilidina	0.05 g
Ácido acético glacial	500 μ l
Agua grado MQ	c.b.p.

<u>PBS 20X pH 7.5</u>	<u>500 ml</u>
NaCl	81.81 g
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	3.86 g
Na ₂ HPO ₄	10.22 g
Água MQ	c.b.p.
<u>Solución de bloqueo</u>	<u>30 ml</u>
Leche Svelty 5%	1.25 g
PBS 1X	30 ml

<u>Solución de lavado</u>	<u>30 ml</u>
PBS 1X	30 ml
<u>Solución anticuerpo primario 1:1000</u>	<u>30 ml</u>
PBS 1X	30 ml
BSA 1%	0.3 g
Anticuerpo (Anti-ADH)	30 μ l
<u>Solución Anticuerpo secundario 1:10,000</u>	<u>20 ml</u>
PBS 1X	20 ml
BSA 1%	0.2 g
Anticuerpo	2 μ l
<u>Buffer AP</u>	<u>100 ml</u>
Tris-base	1.21 g
NaCl	0.58 g
MgCl ₂ · 6 H ₂ O	1.51 g
Agua MQ	c.b.p.
<u>Solución de revelado</u>	<u>15 ml</u>
Buffer AP	15 ml
NBT 50 mg/mL	66 μ l
BCIP 50 mg/ml	33 μ l

Protocolo

- Correr 50 μ g de proteína en un gel de 12.5% de poliacrilamida desnaturizante, por duplicado. Uno teñir con Comassie.
- Transferencia:
 - Humedecer la membrana de nitrocelulosa y papel filtro con buffer Towbin.
 - Equilibrar el gel por 15 minutos en buffer Towbin.
 - Colocar el papel filtro humedecido en la placa (ánodo) de la cámara de transferencia, evitando la formación de burbujas.
 - Colocar la membrana sobre el papel filtro.
 - Encima colocar el gel, eliminando todas las burbujas que se formen.

- Colocar encima papel filtro humedecido.
 - Colocar la tapa del cátodo, cerrar y conectar.
 - Correr por 30 minutos a 10 volts.
-
- Teñir con rojo de Ponceau, para visualizar la transferencia de las proteínas y el marcador de peso molecular (marcar y cortar). Lavar la membrana hasta eliminar todo el colorante.
 - Lavar la membrana con PBS 1X.
 - Incubar la membrana con solución de bloqueo por toda la noche a temperatura ambiente en agitación constante.
 - Lavar la membrana con PBS 1X, por 2 veces durante 5 minutos cada vez.
 - Incubar la membrana con la solución del anticuerpo primario a 4°C en agitación constante.
 - Lavar la membrana por 4-5 veces durante 5 minutos cada vez con solución de lavado.
 - Incubar la membrana con la solución del anticuerpo secundario durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación constante.
 - Lavar la membrana con solución de lavado por 4-5 veces durante 5 minutos por vez.
 - Revelar la reacción con la solución de revelado. El desarrollo de la reacción puede llevar de 5-20 minutos.
 - Detener la reacción con agua destilada y dejar secar la membrana.

Anexo 8

Purificación por cromatografía de afinidad

(Ni-NTA, Invitrogen)

Protocolo en condiciones nativas:

Preparación de lisados celulares

- Cosechar las células del cultivo de la expresión por centrifugación. Resuspender las células en native binding buffer.
- Adicional 20 mg/ml de lisozima e incubar en hielo por 30 minutos.
- Sonicar la muestra sobre una cama de hielo. Dar pulsos de alta intensidad en periodos de 10 segundos con pausas de 10 segundos entre cada pulso.
- Centrifugar el lisado a 7000 rpm por 15 minutos. Transferir el sobrenadante a un tubo limpio.

Preparación de la columna con la resina NI-NTA agarose

- Resuspender la resina en la botella
- Pipetear 2 ml de la resina y agregarla en una columna de 10 ml. Permitir que la resina se asiente por gravedad y suavemente aspirar el sobrenadante.
- Adicionar agua destilada estéril y resuspender la resina por inversión.
- Permitir que la resina se asiente y aspirar suavemente el sobrenadante, repetir por dos lavados.
- Adicionar *native binding buffer* y resuspender la resina por inversión. Permitir que la resina se asiente por gravedad a 4°C y aspirar el sobrenadante.

Protocolo de purificación en condiciones nativas

- Adicionar el lisado celular preparado en condiciones nativas.
- Dejar unir con la resina por 30-60 minutos en agitación y a 4°C.
- Asentara la resina por gravedad y cuidadosamente aspirar el sobrenadante y guardar este a 4°C.
- Lavar con el *native wash buffer* 20mM de imidazol. Dejara asentar la resina por gravedad a 4°C y aspirar el sobrenadate y repetir el lavado con *native wash buffer* 50mM de imidazol.
- Dar un lavado extra con *native wash buffer* 20mM de imidazol dejar asentar la resina a 4°C y aspirar el sobrenadante.
- Adicionar *native elution buffer* mezclar por inversión y colocar la columna de manera vertical para permitir que la resina se asiente todo a 4°C. Posteriormente eluir suavemente y colectar.

Buffers para TAA43:

Native binding buffer: 50 mM NaH₂PO₄, 500 mM NaCl, 10 mM imidazole; pH 8.0

Native wash buffer: 50 mM NaH₂PO₄, 500 mM NaCl, 20 mM imidazole; pH 8.0

Native wash buffer: 50 mM NaH₂PO₄, 500 mM NaCl, 50 mM imidazole; pH 8.0

Native elution buffer: 50 mM NaH₂PO₄, 500 mM NaCl, 250 mM imidazole; pH 8.0

Buffers para Ta0841 ADH:

Native binding buffer: 50 mM NaH₂PO₄, 500 mM NaCl; pH 8.0

Native wash buffer: 50 mM NaH₂PO₄, 500 mM NaCl, 5 mM imidazole; pH 8.0

Native wash buffer. 50 mM NaH₂PO₄, 500 mM NaCl, 10 mM imidazole; pH 8.0

Native elution buffer. 50 mM NaH₂PO₄, 500 mM NaCl, 50 mM imidazole; pH 8.0

Anexo 9

Cuantificación de proteínas por el método de Lowry

Reactivos

Solución	Compuestos
A	Sulfato cúprico penta-hidratado 0.5%
B	Tartrato de sodio y potasio 1%
C	Carbonato de sodio 2% en NaOH 0.1 N
E	1 ml Sol. A 1 ml Sol. B 98 ml Sol. C
Folin Ciocalteu	Dilución 1:2 en agua destilada

Protocolo

- En tubos de ensaye de vidrio agregar:

Blanco: 1ml de agua destilada

Muestras: 975 µl de agua destilada

25 µl de la muestra (dilución 1:40)

- Agregar 5 ml de reactivo E y dejar reposar por 10 minutos
- Agregar 500 µl de reactivo de Follin (1:2) mezclar y reposar por 30 minutos
- Leer absorbancias a una longitud de onda de 590 nm
- Calcular la concentración de acuerdo a la curva de estándar en uso.

Anexo 10

Cuantificación de proteínas por el método de GuHCl
(Hidrocloruro de guanidina)

Reactivos

Buffer pH 6.5

Guanidina-HCl	7.5 M
Fosfato de sodio	0.025 M

Protocolo

- En una celda de cuarzo adicionar 950 μ l de buffer pH 6.5
- Adicionar 50 μ l de la proteína
- Mezclar perfectamente y leer a 280 nm
- Calcular la concentración de la proteína con la ley de Lambert-Beer

$C = A / \epsilon l$ donde: C= Concentración

A= Absorbancia 280 nm

ϵ = Coeficiente de extinción molar de la proteína

l= Longitud de la celda

Coeficiente de extinción molar de la albúmina bovina

$$\epsilon = 52,165 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

Coeficiente de extinción molar de TAA43

$$\epsilon = 29,130 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

Anexo 11

Soluciones para medir actividad ATPasa

<u>Buffer de reacción</u>	<u>5 ml</u>
MES 50 mM pH 5.5	250 μ l
MgCl ₂ 10 mM	50 μ l
L-Cysteina 2 mM	10 μ l
ATP 1 mM	5 μ l

<u>Reactivo de color</u>	<u>5 ml</u>
Triton 1-X 2%	2 μ l
Molibdato de amonio 4.2% en HCl 4N	10 ml
Verde malaquita 0.045%	30 ml

- Mezclar 3 vol. de la solución de verde malaquita 0.045% con 1 volumen de molibdato de amonio 4.2% y mezclar con barra magnética por 30 min.
- Filtrar la solución por watman 0.45 μ m. Poner la solución en una botella de vidrio pre-tratada con HCl 1N, proteger de la luz.
- Adicionar 2 μ l de Triton 1-X 2%
- Guardar a 4°C. Solución estable por una semana.

<u>Citrato de sodio 34%</u>	<u>5 ml</u>
Citrato de sodio	1.7 g

<u>Fosfato dibásico de potasio 0.4 mM</u>	<u>5 ml</u>
KH ₂ PO ₄	0.272 mg