

IPICYT

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

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

**“Coexpresión de la Penicilino Acilasa y
Chaperonas Moleculares en *Escherichia coli*”**

Tesis que presenta

Zazil Donaxí Alvarado Cuevas

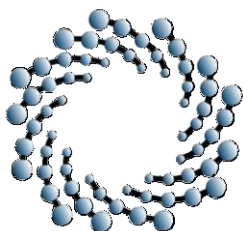
Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias en Biología Molecular

Director de la Tesis:

Dr. Antonio de León Rodríguez

San Luis Potosí, S.L.P., Julio 2010



IPICYT

Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**Coexpresión de la Penicilino Acilasa y Chaperonas Moleculares en *Escherichia coli***” presentada para obtener el Grado de de Maestra en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Zazil Donaxí Alvarado Cuevas** y aprobada el **30 de Junio del 2010** 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.

Dr. Antonio de León Rodríguez

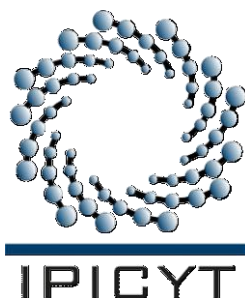
(Director de la tesis)

Dra. Martha Leticia Santos Martínez

(Asesora de la tesis)

Dr. Alejandro de las Peñas

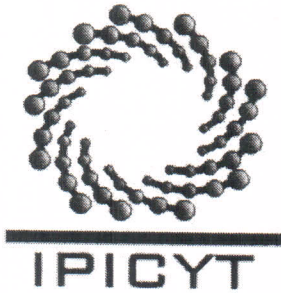
(Asesor de la tesis)



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 del Dr. Antonio del León Rodríguez.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología 223360 y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.



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 070 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular esta asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 9 días del mes de julio del año 2010, se reunió a las 17:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Antonio De León Rodríguez	Presidente	IPICYT
Dr. Alejandro De Las Peñas Nava	Secretario	IPICYT
Dra. Martha Leticia Santos Martínez	Sinodal	IPICYT

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

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustenta la C.

Zazil Donaxí Alvarado Cuevas

sobre la Tesis intitulada:

Coexpresión de la Penicilino Acilasa y Chaperonas Moleculares en Escherichia coli

que se desarrolló bajo la dirección de

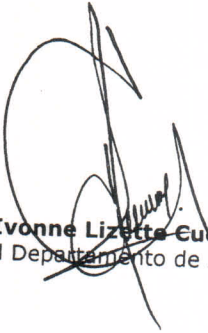
Dr. Antonio De León Rodríguez

El Jurado, después de deliberar, determino

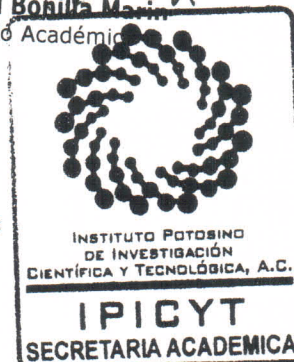
APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 18:40 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., Mexico, a los 9 días del mes de julio de 2010.


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


Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico



Dedicatorias

A Dios por haberme dado la oportunidad de llegar a este momento.

A mi madre, Ma. de Jesús, por todo lo que me ha enseñado, por su amor y apoyo, pero sobretodo por siempre estar ahí cuando la necesité.

A mi hermano, Yoltzin, por inspirarme a superarme y seguir adelante.

A Jorge por estar a mi lado apoyándome y alentándome desde el principio.

A mis amigos, tanto de laboratorio y generación, por cada momento de alegría.

A mi padre, José, por apoyarme.

Agradecimientos

Al Dr. Antonio de León Rodríguez por haberme admitido en su grupo de trabajo,
además de sus consejos y asesoría.

A la Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa por las facilidades prestadas.

A la Dra. Leticia Santos Martínez por el tiempo prestado en la revisión de esta
tesis.

Al Dr. Alejandro de las Peñas por el tiempo prestado en la revisión de esta tesis
así como por su asesoría.

A Jorge Sáenz Mata por todo su apoyo, comprensión y sobretodo amor.

A todos mis compañeros y amigos del laboratorio Luis, Mabel, Gaby, Toñito,
Arlette, y Vania por su amistad y consejos.

A Karla, Silvia, Paco y Julia, con quienes empecé esta aventura y me brindaron su
amistad.

A Leandro Gabriel Ordóñez por todos los consejos aportados así como su
amistad.

Al CONACYT por la beca otorgada N° 223360.

A todos los que de manera directa e indirecta colaboraron en la realización de este
trabajo.

Muchísimas Gracias

Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Acta de examen	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Lista de tablas	ix
Lista de figuras	x
Abreviaturas	xii
Resumen	xiv
Abstract	xv
1. Antecedentes	
1.1 Penicilino Acilasa	1
1.2 Ntn-hidrolasas	1
1.3 Expresión del gen <i>pac</i> y su procesamiento	2
1.4 Exportación de PA	4
1.5 Uso de PA en la industria.	5
1.6 Proteínas Recombinantes	5
1.7 Chaperonas Moleculares	6
1.7.1 DnaK-DnaJ-GrpE	8
1.7.2 GroEL-GroES	9
1.7.3 ClpB	10

1.7.4 Uso de chaperonas	11
1.8 Sistema de Autotransporte	11
2. Objetivos	15
3. Materiales y Métodos	16
3.1 Cepas Bacterianas	16
3.2 Plásmidos	16
3.3 Vectores	16
3.4 Construcción del vector de PA fusionado al autotransportador MisL	17
3.5 Medios de Cultivo	19
3.6 Inóculos	19
3.7 Conservación de las Cepas	19
3.8 Aislamiento del plásmido pPA102	20
3.9 Tratamiento de Muestras	20
3.10 Determinación de Actividad enzimática de PA	20
3.11 Determinación de Proteína	21
4. Resultados y Discusión	22
4.1 Efecto de la co-expresión de chaperonas	22
4.2 Vectores PA y PA fusionado al autotransportador MisL	27
5. Conclusiones y Perspectivas	30
6. Referencias Bibliográficas	31
7. Anexos	36
A. Protocolos	36
B. Soluciones	39
C. Curvas Estándar	45

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1 Chaperonas Citoplasmáticas	7
Tabla 2 Ejemplos de chaperonas inmovilizadas utilizadas para re-plegamiento <i>in vitro</i>	11
Tabla 3 Ejemplos de proteínas recombinantes y péptidos expresados en la superficie celular por autotransporte	14
Tabla 4 Plásmidos utilizados y sus características	22
Tabla 5 Datos de la co-expresión de PA y las respectivas chaperonas	25
Tabla C.1 Curva estándar para determinación de actividad enzimática.	45
Tabla C.2 Curva estándar para determinación de proteínas.	46

LISTA DE FIGURAS

	Página
Fig.1 Hidrólisis de la penicilina G por acción de la Penicilino Acilasa.	1
Fig.2 Diagrama Topológico de la Ntn-hidrolasas.	2
Fig.3 Detalles de la región codificante para las subunidades α y β de PA.	2
Fig. 4 Síntesis y maduración de PAC en <i>E. coli</i> .	3
Fig. 5 Esquema general para la exportación de proteínas por la vía Sec y Tat en <i>E. coli</i> .	4
Fig.6 Modelo de la interacción de DnaK con proteínas agregadas.	8
Fig.7 Plegamiento de proteínas asistido por chaperonas en el citoplasma de <i>E. coli</i> .	9
Fig.8 Modelo del mecanismo de acción de ClpB junto con el sistema DnaK.	10
Fig.9 Estructura del precursor del autotransportador.	12
Fig.10 Mecanismo de secreción de los autotransportadores.	13
Fig.11 Mapa del vector de clonación pGEM®-T Easy	16
Fig.12 Mapa del vector de clonación pCR®4Blunt-TOPO®	17
Fig.13 Amplificación por PCR y clonación del fragmento del dominio β de MisL.	18
Fig.14 Amplificación por PCR y clonación del gen <i>pac</i> .	19
Fig.15 Clonación de la construcción PAspPA-MisL	20
Fig.16. Clonación del amplicón del gen <i>pac</i> .	20
Fig.17 Expresión electroforética en condiciones desnaturalizantes de la cepa recombinante JM101/pPA102 con las diferentes chaperonas	26
Fig.18 Relación de la Actividad Enzimática Específica (AE) en cada condición.	28

Fig. 19 Representación de los vectores de expresión.	29
Fig. C1 Curva estándar de actividad enzimática.	46
Fig C.2 Curva estándar de proteínas.	47

ABREVIATURAS

6-APA	Ácido 6-aminopenicilánico
aa	Aminoácidos
AE	Actividad enzimática específica
AFA	Ácido fenilacético
Amp	Ampicilina
AV	Actividad enzimática volumétrica
Cm	Cloranfenicol
D.O.	Densidad óptica
g	Gramos
hr	Horas
IPTG	Isopropil tio- β -D-galactopiranosido
Kan	Kanamicina
kb	Kilopares de bases
kDa	Kilodalton
mg	Miligramos
μ g	Microgramos
ml	Mililitros
μ l	Microlitros
PA	Penicilino acilasa
PBS	Buffer de fosfatos salino
PDAB	<i>p</i> -dimetilaminobenzaldehído
preproPA	Subunidad alfa y beta de la penicilino acilasa más el péptido señal y el péptido conector.
proPA	Subunidad alfa y beta de la penicilino acilasa más el péptido conector

PSA	Persulfato de amonio
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sodio
U/ml	Unidades de actividad enzimática por mililitro de cultivo
U/mg prot	Unidades de actividad enzimática por miligramo de proteínas

Resumen

“Coexpresión de la Penicilino Acilasa y Chaperonas Moleculares en *Escherichia coli*”

La penicilino acilasa (PA) hidroliza la penicilina G produciendo ácido fenilacético y ácido 6-aminopenicilánico, siendo este último precursor de varios antibióticos semisintéticos. En el presente trabajo se evaluó la co-expresión de chaperonas moleculares para analizar el papel de estas en la expresión de la PA. Las chaperonas estudiadas fueron: DnaK-DnaJ; GroEL-GroES; ClpB y DnaK-DnaJ-GrpE-ClpB. Al utilizarse IPTG (25 μ M) como inductor se presentó un aumento del 33.3% en la actividad de PA en el caso de DnaK-DnaJ; pero al expresarse GroEL-GroES la actividad disminuyó un 70.8%; un 60.4% al expresarse ClpB y un 29.2% en el caso de DnaK-DnaJ-GrpE-ClpB. Cuando solo se utilizó galactosa (5 g/l) hubo un aumento del 2.4% en la actividad de PA cuando se expresó DnaK-DnaJ y 4.8% para DnaK-DnaJ-GrpE-ClpB; mientras que disminuyó un 76.2% y 59.5% para el caso de GroEL-GroES y ClpB respectivamente. Por lo que, de las chaperonas evaluadas DnaK-DnaJ, al ser inducidas con IPTG, son las que mostraron un mejor rendimiento en la actividad de PA, mientras que GroEL-GroES por otro lado disminuye notablemente dicha actividad. Aún es necesario analizar el papel de más chaperonas especialmente las relacionadas con la vía Tat y la vía de autotransporte, que se llevará a cabo utilizando el dominio β del autotransportador MisL perteneciente a *Salmonella enterica*.

Palabras Clave: Penicilino Acilasa, Chaperonas, DnaK-DnaJ

Abstract

"Coexpression of Penicillin Acylase and Molecular Chaperones in *Escherichia coli*"

The penicillin acylase (PA) hydrolyzes penicillin G to produce phenylacetic acid and 6-aminopenicillanic acid, which is a precursor of several semi-synthetic antibiotics. We evaluated the co-expression of molecular chaperones to analyze the role of these in the expression of PA. The chaperones studied were DnaK, DnaJ, GroEL-GroES, ClpB and DnaK-DnaJ-GrpE-ClpB. When we used IPTG (25 μ M) as inducer it was shown an increase of 33.3% in the activity of PA in the presence of DnaK-DnaJ, but in the presence of GroEL-GroES, ClpB and DnaK-DnaJ-GrpE-ClpB the activity decreased 70.8%, 60.4% and 29.2%, respectively. When we used galactose only (5 g/l) there was an increase of 2.4% and 4.8% in the PA activity when DnaK-DnaJ and DnaK-DnaJ-GRPE-ClpB were over-expressed, respectively. But in the presence of ClpB and GroEL-GroES the activity of PA decreased 76.2% and 59.5%, respectively. Therefore, DnaK-DnaJ over-expressed with IPTG, showed a slight improvement on the activity of PA, meanwhile GroEL-GroES decreases significantly such activity. It will be needed further studies in order to analyze the role of more chaperones, in particular, those related to the Tat and autotransporter pathways. The last pathway will be evaluated using the β domain of the autotransporter MisL that belongs to *Salmonella enterica*.

KEY WORDS: Penicillin Acylase, Chaperones, DnaK-DnaJ

1. ANTECEDENTES

1.1 PENICILINO ACILASA

La producción de penicilina y cefalosporina es una operación industrial mayor de 10,000 toneladas. Tanto la bencil- como la fenoximetil- penicilinas son productos de fermentaciones fúngicas y son precursores de una gran variedad de antibióticos semisintéticos (por ejemplo: amoxicilina y ampicilina). La modificación química del producto de la fermentación es iniciada por la remoción del grupo acil quedando solo el núcleo del ácido 6-aminopenicilánico (6-APA). También pueden ser adicionados grupos acyl sintéticos para conferir nuevas propiedades al antibiótico, como resistencia al ácido estomacal, cierto grado de resistencia a penicilinasas o un extenso rango de actividad antibiótica. El método de elección para la conversión a 6-APA en una escala industrial, es el uso de penicilino acilasa (Spence and Ramsden, 2007).

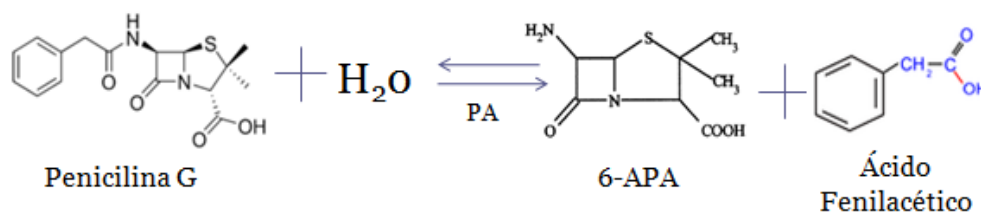


Fig.1 Hidrólisis de la penicilina G por acción de la Penicilino Acilasa. Modificado de Spence and Ramsden, 2007.

1.2 Ntn-hidrolasas

La penicilino acilasa es un miembro de la superfamilia de las Ntn-hidrolasas (N-terminal nucleofílicas), las cuales se caracterizan por tener una treonina, cisteína o serina catalítica en la posición N-terminal (Kheirulomoom *et al.*, 2001). Esta familia fue reconocida por Brannigan en 1995. El típico pliegue de esta superfamilia consiste en un núcleo con cuatro capas ($\alpha\beta\beta\alpha$) catalíticamente activas. Este núcleo está formado por 2 hojas β antiparalelas y estas hojas están cubiertas por una capa de α -hélices antiparalelas, y para el caso de la PA los sitios activos se encuentran en la hoja β -5 (24Phe), en la β -11 (67Ser) y en la β -12 (57Phe) (Oinonen and Rouvinen, 2000).

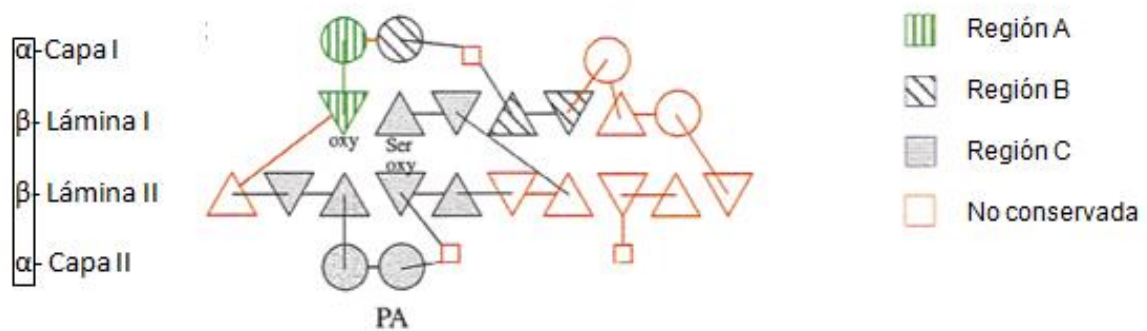


Figura 2. Diagrama Topológico de las Ntn-hidrolasas. Los círculos representan α -hélices y los triángulos láminas- β . Modificado de Oinonen and Rouvinen, 2000.

1.3 Expresión del gen *pac* y su procesamiento.

El gen *pac* se encuentra codificado en 4 dominios estructurales:

- péptido señal: 1-78 pb;
- subunidad α : 79-705 pb;
- péptido conector: 106-867pb; y
- subunidad β : 867-2538 pb. (Schumacher, 1986)

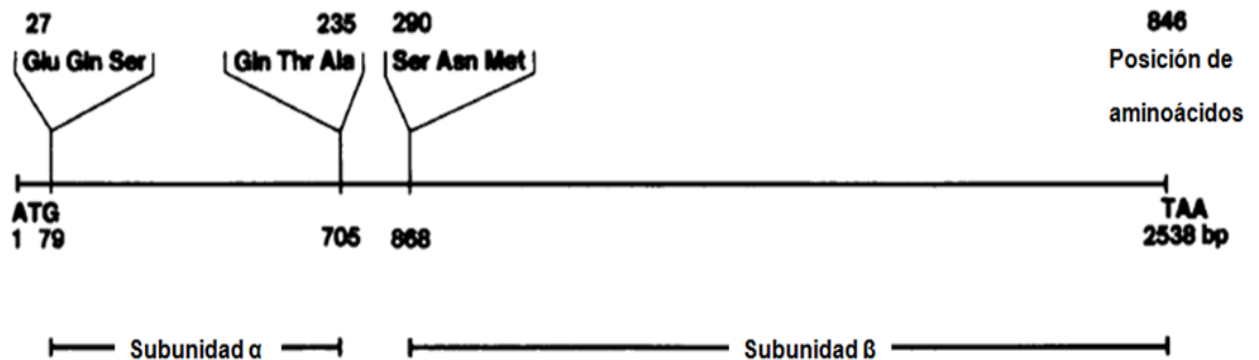


Fig.3 Detalles de la región codificante para las subunidades α y β de PA. Los números en la parte inferior corresponden a los dominios del gen *pac*, mientras que los números superiores a las posiciones de los 3 aa tanto iniciales como finales de las subunidades α y β respectivamente. Modificado de Schumacher *et al.*, 1986.

La expresión del gen de la penicilino acilasa (*pac*) en *E. coli* es inducido por ácido fenilacético y reprimido por glucosa (Merino, 1992).

PAC es normalmente producida a temperaturas entre 20 y 30°C, y a 37°C no hay procesamiento. Esto se debe a que un proceso proteolítico sensible a temperatura esté involucrado en la maduración de la enzima activa. Además, el plegamiento incorrecto a altas temperaturas resulta en una enzima inactiva.

Los pasos de procesamiento involucrado en la formación de las subunidades activas son:

- 1) síntesis del polipéptido precursor (preproPAC), el cual contiene un péptido señal, una subunidad α , péptido espaciador y una subunidad β , todas codificadas por el gen *pac*;
- 2) transporte del péptido precursor al espacio periplásmico y la eliminación del péptido señal (proPAC);
- 3) digestión proteolítica del espaciador por la escisión en el extremo N-terminal del péptido β ;
- 4) eliminación del péptido espaciador gracias a un proceso proteolítico C-terminal (Spence and Ramsden, 2007).

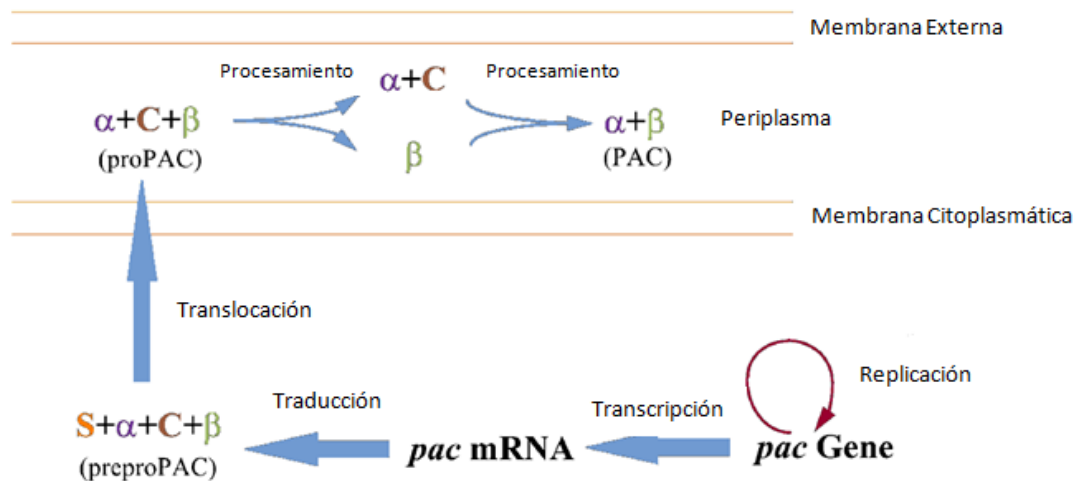


Fig. 4 Síntesis y maduración de PAC en *E. coli*. Modificado de Lin *et al.*, 2001.

1.4 Exportación de PA

Gracias a experimentos de mutaciones en el péptido señal de PA, se ha visto que el transporte de esta enzima es dependiente de Tat (Ignatova *et al.*, 2001).

El sistema Tat (twin-arginine translocation) reconoce sustratos que poseen un péptido señal en el cual un motivo 'twin-arginine' juega un papel importante (Ser-Arg-Arg-Xaa*-Phe-Leu-Lys).
*Xaa = cualquier aminoácido

Los componentes clave de esta vía son codificados por el operón *tatABC*, donde *tatA* y *tatB* codifican para proteínas pequeñas de 9.6 y 18.4 kDa respectivamente, y TatC es una proteína de 28.9 kDa, la cual tiene 4 dominios transmembranales (TM), mientras que tanto TatA como TatB tienen solo un dominio.

También se encuentra el gen *tatE* que no se encuentra en el operón *tatABC* y que codifica para un parálogo de TatA, el cual se expresa a muy bajos niveles. Por lo que si existiera una alteración relacionada con TatA (ej. mutación) TatE podría evitar el bloqueo de la vía Tat.

El ciclo para el transporte de proteínas al periplasma por la vía Tat inicia cuando el péptido señal específico de esta vía se une al complejo TatBC de la membrana citoplasmática a través de TatC. Posteriormente por un gradiente electroquímico transmembranal de protones, TatA se asocia al módulo TatBC, para formar el complejo TatABC, en donde la proteína es transportada al periplasma a través de un canal formado en la membrana por múltiples moléculas de TatA, finalmente el complejo TatABC se disocia en TatBC y TatA (Palmer *et al.*, 2005).

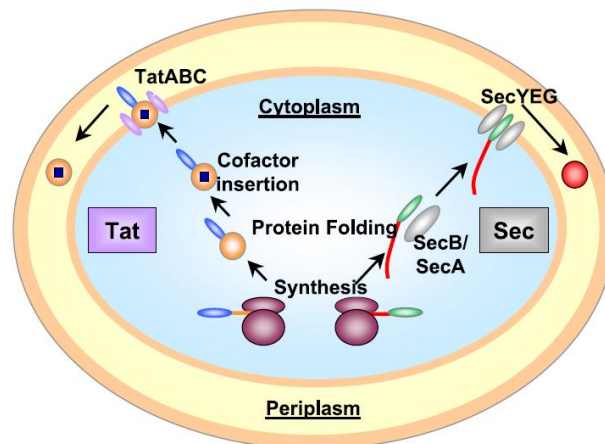


Fig. 5 Esquema general para la exportación de proteínas por la vía Sec y Tat en *E. coli*. Tomada de Robienson *et al.*, 2004.

La gran ventaja de este sistema es que transloca proteínas grandes y completamente plegadas a través de las membranas, a diferencia de la vía Sec que transloca proteínas pequeñas y sin plegar. Así, las proteínas redox periplásmicas que contienen complejos cofactores son los sustratos principales de esta vía en *E.coli* (Robinson *et al.*, 2004).

1.5 Uso de PA en la industria.

La PAC no sólo ha sido utilizado en producciones a gran escala de penicilinas semisintéticas sino también como biocatalizador en la síntesis de aspartame (Fuganti *et al.*, 1986), para resolución de compuestos quirales (Ng *et al.*, 2001), β -amino ésteres (Roche *et al.*, 1999), aminas (Van Rantwijk *et al.*, 2002) y alcoholes secundarios (Svedas *et al.*, 1996). Estos enantiómeros purificados por el uso de PAC en la resolución de mezclas racémicas son usados como intermediarios en la producción de compuestos bioactivos, como el Xemilofiban (agente antiplaquetario) (Topgi *et al.*, 1999). Otra aplicación importante de PA es en la activación enzimática dirigida de pro-fármacos empleados en la terapia contra el cáncer (Lu *et al.*, 1999) (Vrudhula *et al.*, 1993).

1.6 Proteínas Recombinantes

Los recientes avances en el campo de la expresión de genes heterólogos en bacterias para obtener grandes cantidades de los polipéptidos deseados para investigación o propósitos comerciales, ha llevado al desarrollo de nuevas estrategias para superar los problemas inherentes a su producción. *Escherichia coli* ha sido el hospedero de elección para obtener grandes cantidades de proteínas heterólogas debido a su genética simple, fácil manejo, seguridad y conocimiento de su metabolismo y bioquímica. Sin embargo, la producción de proteínas recombinantes en *E.coli* como hospedero ha tenido severas limitaciones, como lo es la agregación de proteínas en forma de cuerpos de inclusión. La conversión de cuerpos de inclusión insolubles e inactivos a moléculas solubles y bien plegadas constituye un reto y es sabido que el paso de re-plegamiento es una limitante en la mayoría de los casos reportados y resulta en una disminución en el rendimiento de producción (Jhamb *et al.*, 2008).

Tal es el caso de las penicilino acilasas de bacterias Gram negativas que tienden a acumularse dentro del espacio periplásmico formando cuerpos de inclusión (Rajendhran *et al.*, 2002).

Para tratar de resolver este problema se han probado varias estrategias, entre ellas el uso de solventes orgánicos para permeabilizar la membrana y poder obtener la mayor actividad enzimática, tal como lo hicieron De León *et al.* (2003) quienes utilizaron cloroformo y vieron un aumento del 380% en la actividad

enzimática, mientras que al usar acetona y piridina esta se vio reducida, y en el caso de alcoholes (como etanol y metanol) inactivó la enzima.

Otras estrategias han sido el uso de chaperonas moleculares (Xu *et al.*, 2005) y el uso del sistema de autotransporte (Rutherford and Mourez, 2006).

1.7 Chaperonas Moleculares

Se sabe que las chaperonas moleculares ayudan en la vía de plegamiento de proteínas. Un enfoque popular que explora extensamente este punto es la co-expresión de chaperonas junto con la proteína de interés. A pesar de que se han obtenido resultados positivos, las eficacias de estos sistemas dependen en gran medida del tipo de proteína expresada.

Las chaperonas moleculares fueron originalmente clasificadas como un grupo de proteínas no relacionadas que median el correcto ensamblaje de otras proteínas, pero no forman parte de las estructuras funcionales finales. Estas chaperonas son ubicuas y están involucradas en una gran variedad de funciones, las cuales dependen de la etapa del ciclo de vida del sustrato de la proteína. Estas se unen a conformaciones no-nativas de las proteínas y las asisten para alcanzar sus estructuras nativas terciarias. Sin embargo, son vitales para cualquier organismo bajo condiciones de estrés (Jhamb *et al.*, 2008).

Mecanísticamente, las chaperonas moleculares se basan en la exposición diferencial de dominios hidrofóbicos estructurados a solventes para unir segmentos no polares que normalmente estarían dentro del núcleo de sus sustratos. A pesar que hay diferencias sutiles en la composición de las proteínas 'cliente', el típico blanco de las chaperonas, es una región no estructurada de amino ácidos hidrofóbicos flaqueado por residuos básicos y carente de residuos ácidos.

Las chaperonas moleculares pueden ser divididas en tres subclases funcionales, basadas en su mecanismo de acción:

1) chaperonas de plegamiento: como DnaK/DnaJ y GroEL/GroES, las cuales se basan en cambios conformacionales dependientes de ATP, para mediar la relación neta entre el plegamiento y el desplagamiento de sus sustratos;

2) chaperonas de sostén/apoyo: como IbpB, las cuales mantienen parcialmente plegadas a las proteínas en su superficie en la espera de chaperonas de plegamiento disponibles; y

3) chaperonas de desagregación: como ClpB, las cuales promueven la solubilización de proteínas que se han convertido en agregados como resultado de un estrés.

Ejemplos de estas chaperonas se mencionan a continuación en la tabla 1.

Tabla 1 Chaperonas Citoplasmáticas. Tomado y modificado de Baneyx and Mujacic 2004.

Familia	Nombre	Cofactores	Función	Especificidad de sustrato	Requerimiento de ATP
Hsp100 (AAA+) ^a	ClpB		Proteasa	Segmentos ricos en residuos básicos y aromáticos	+
Hsp90	HtpG		Posible chaperona de plegamiento/secreción	No conocida	+
Hsp70	DnaK	DnaJ, GrpE	Chaperona de plegamiento	Segmentos de 4-5 aa hidrofóbicos, enriquecidos en leucina y flanqueados por residuos básicos	+
	HscA	HscB	Proteína de ensamble del grupo Fe-S	Motivo LPPVK en IscU, proteína de ensamble de grupo Fe-S	+
	HscC	YbeV, YbeS	Regulación σ^{70}	No conocido	+
Hsp60	GroEL	GroES	Chaperona de plegamiento	Pliegues α/β ricos en residuos básicos e hidrofóbicos	+
Hsp33	Hsp33		Chaperona de sostén	No conocido	-
Superfamilia DJ-1	Hsp31		Chaperona de sostén	No conocido	- ^b
Pequeñas Hsps	IbpA, IbpB		Chaperona de sostén	No conocido	- ^c
PPIasa	TF		Chaperona de sostén, PPIasa	Motivo de 8 aa ricos en residuos básicos y aromáticos	-
SecB	SecB		Chaperona de secreción	Motivo de 9 aa ricos en residuos básicos y aromáticos	-

^a AAA+, ATPasas asociadas a diversas actividades celulares, ^b la unión ATP regula negativamente la actividad de chaperona de Hsp31 a altas temperaturas, ^c la unión de ATP a ciertas sHsps provoca el cambio conformacional y la liberación de sustrato.

En el citoplasma de *E. coli*, el plegamiento *de novo* involucra 3 sistemas de chaperonas: trigger factor (TF), DnaK-DnaJ-GrpE y GroEL-GroES (Baneyx and Mujacic, 2004), por lo que se hablará de forma general de los dos últimos

sistemas, así como de la proteasa ClpB, ya que juega un papel importante en la eliminación de cuerpos de inclusión, condición de estrés para la célula.

1.7.1 DnaK-DnaJ-GrpE

Estructuralmente la proteína DnaK consiste en un dominio NH₂-terminal altamente conservado de 44 kDa y con función de ATPasa, además de un dominio COOH-terminal de 25 kDa. Este último dominio se encuentra a su vez dividido en un dominio conservado de unión a sustrato de 15 kDa y un dominio COOH-terminal un poco menos conservado de 10kDa.

Las proteínas DnaJ son un grupo heterogéneo de proteínas con un multidominio altamente conservado de aproximadamente 80 aa, llamado dominio J, con frecuencia localizado cerca del extremo N-terminal.

De acuerdo al modelo propuesto por Bukau *et al.* (1998) el ciclo del sistema DnaK comienza con la asociación de DnaJ con el sustrato, seguida de la transferencia del sustrato a DnaK-ATP. La hidrólisis de ATP asegura el sustrato en el 'hueco' de DnaK, entonces ocurre la hidrólisis de ATP a ADP y la disociación de DnaJ. GrpE se une a este complejo DnaK-ADP-sustrato, desencadenando la liberación del ADP. Como consecuencia, ATP se une a DnaK, lo cual libera al sustrato y a GrpE, y dependiendo de la vía que tome, el sustrato liberado puede ser liberado al citosol o entrar de nuevo a este sistema para modificaciones posteriores. De acuerdo a Acebrón *et al.* (2008) este ciclo puede comenzar ya sea que el sustrato se una a DnaJ o interactúe con DnaK-ATP.

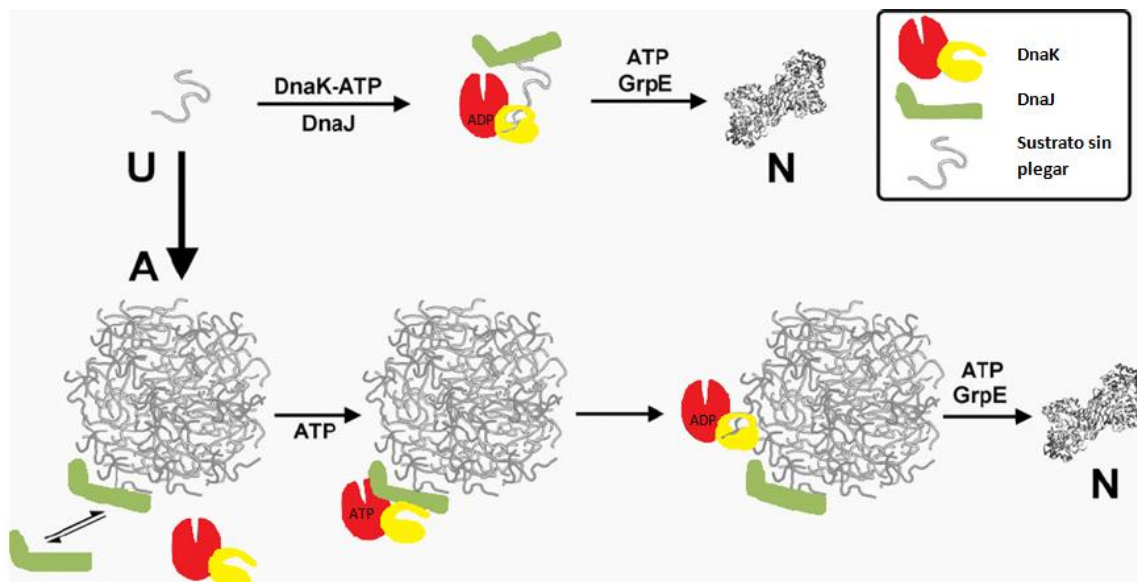


Fig.6 Modelo de la interacción de DnaK con proteínas agregadas. Donde **U** es el sustrato sin plegar; **A** se refiere a agregados de proteínas y **N** a la proteína en su estructura nativa. Modificado de Acebrón *et al.*, 2008.

1.7.2 GroEL-GroES

GroEL consiste en dos anillos heptaméricos de subunidades de 57 kDa que tienen una estructura de 3 dominios. El dominio apical forma la apertura del cilindro y expone un número de residuos de aa hidrofóbicos hacia el centro, los cuales se piensa interactúan con las superficies complementarias del sustrato. También posee un dominio intermedio que une el dominio apical con el ecuatorial y con el gran dominio ecuatorial, el cual posee un dominio de unión a nucleótido.

Mientras que GroES es un heptámero de subunidades de 10 kDa y embona exactamente en la estructura de cilindro formada por GroEL.

Mecánicamente, la unión del sustrato a un anillo de GroEL es seguido de la unión de 7 moléculas de ATP y GroES, resultando en la encapsulación del sustrato. Después de la unión de GroES, GroEL experimenta una serie de cambios conformacionales, los cuales consisten en una ampliación de la cavidad y un cambio en la superficie hacia un ambiente más hidrofílico. Todo esto provee las condiciones necesarias para que una proteína se pueda plegar correctamente. Posterior a la hidrólisis del ATP y la unión de ATP en el anillo opuesto, GroES y el sustrato son liberados (Jhamb *et al.*, 2008).

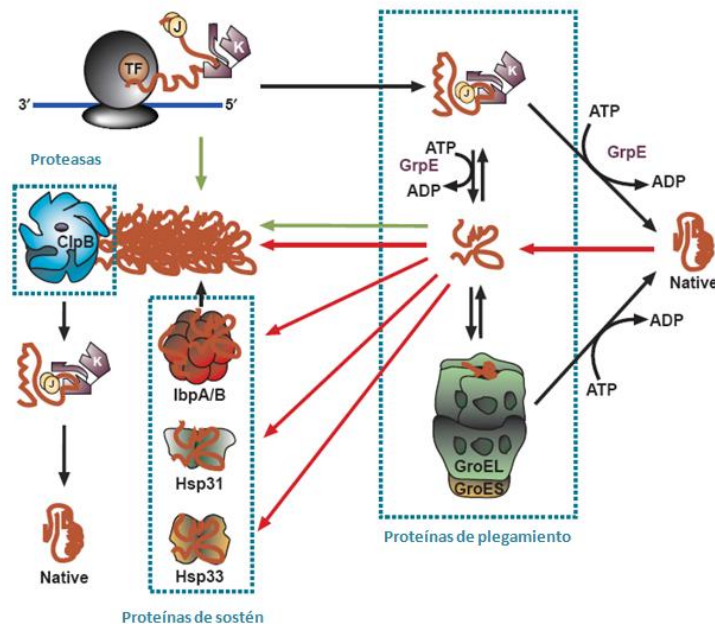


Fig.7 Plegamiento de proteínas asistido por chaperonas en el citoplasma de *E. coli*. Modificado de Baneyx and Mujacic, 2004.

1.7.3 ClpB

ClpB es una AAA+ (ATPasa asociada a diversas funciones celulares) (Doyle *et al.*, 2009), además es una proteína hexamérica que consiste en dos protómeros idénticos, cada protómero contiene un dominio N-terminal y dos dominios AAA+ de unión a nucleótido 1 y 2 (NBD-1 y NBD-2, por sus siglas en inglés), así como un dedo de arginina. Estos dos protómeros están arreglados en un anillo con un poro axial (canal) y presenta 12 sitios de unión a ATP, la cual ocurre en la interface de las subunidades adyacentes, además de que estabiliza el hexámero (Lee *et al.*, 2003) (Akoev *et al.*, 2004). Además, la unión de ATP es requerida la interacción del sustrato con los residuos conservados del poro del ClpB hexamérico (Schlieker *et al.*, 2004) (Weibezahn *et al.*, 2004). ClpB posee un gran dominio espiral intermedio insertado en NBD-1, lo cual lo diferencia de otras proteínas Clp. Este dominio ha sido implicado en la coordinación de la comunicación entre NBD-1 y NBD-2 así como en la interacción de ClpB con el sistema DnaK (Hasberger *et al.*, 2007). También se ha visto que con un sustrato que ClpB y el sistema DnaK tengan la capacidad de desagregar, los dos chaperones trabajarán juntos sinérgicamente. Esta acción sinérgica de ClpB y el sistema DnaK es gracias al ATP. ClpB es único entre las Clp (A y X) ya que es capaz de actuar sinérgicamente con el sistema DnaK (Doyle *et al.*, 2007). Además la hidrólisis de ATP es estimulada por la presencia combinada de ClpB, DnaK y el sustrato (Hoskins *et al.*, 2009).

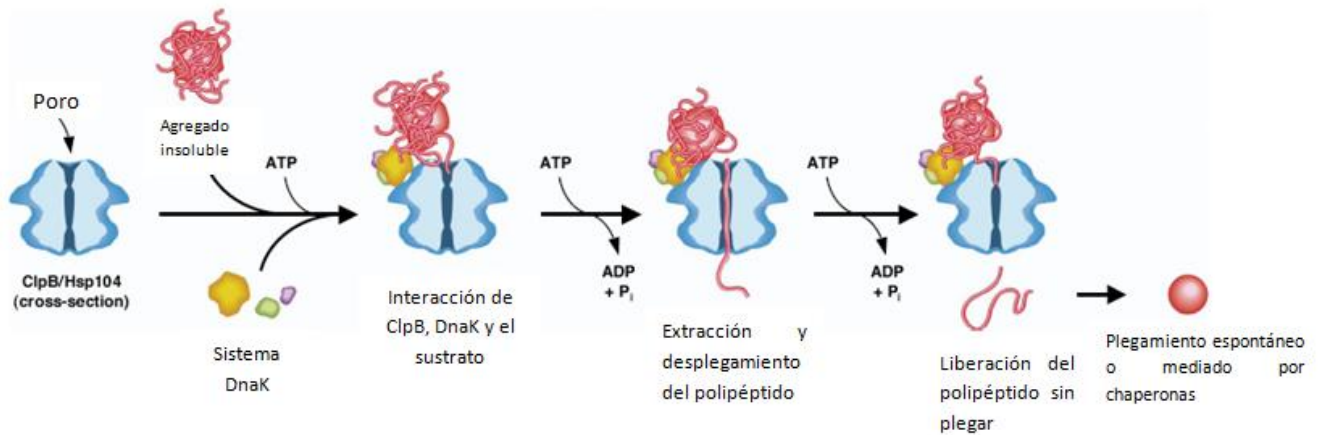


Fig.8 Modelo del mecanismo de acción de ClpB junto con el sistema DnaK. Modificado de Doyle *et al.*, 2007.

1.7.4 Uso de chaperonas

El plegamiento de proteínas en el citosol es un mecanismo complejo ayudado por chaperones moleculares dependientes de ATP y requiere cofactores para un plegamiento eficiente.

Varios autores han tratado de sobreexpresar y co-transformar los moduladores de plegamiento GroEL-ES, DnaK-J-GrpE para aumentar la solubilidad de proteínas recombinantes. Unos ejemplos son:

Tabla 2 Ejemplos de chaperonas inmovilizadas utilizadas para re-plegamiento *in vitro*. Modificada de Jhamb *et al.*, 2008.

Chaperona	Soporte de inmovilización	Proteína blanco	Efecto en la actividad	Observaciones	Referencia
GroEL	Proteína A unida a IgG	TUB glutamina sintetasa	Recuperación 30-40%	Se perdió actividad debido: *agregados atrapados físicamente en la columna; *adsorción no específica; *inhibición por el anticuerpo en la interacción de GroEL-PFI con GroES y/o ATP	Phadtare <i>et al.</i> , 1994.
GroEL minichaperona	Resina Ni-NTA	hINF- γ	Actividad relativa 115.4%	La columna utilizada puede ser reutilizada 4 veces.	Gao <i>et al.</i> , 2003.
Mini-GroEL+DsbA+PPI	Sefarosa NHS-activada	Toxina de escorpión, Cn5	Recuperación 100%	Recuperación casi nula solo utilizando buffer o con cada una de las chaperonas por separado	Altamarino <i>et al.</i> , 1999.
PDI	Sefarosa CnBr-activada	Lisozima	80-90%	-	Muronetz <i>et al.</i> , 1998.

1.8 Sistema de Autotransporte

El expresar proteínas de interés fusionadas a la membrana bacteriana es una técnica poderosa, por lo que los autotransportadores han emergido como una herramienta para expresar proteínas en la superficie bacteriana y puedan ser

usadas como 'biofábrica' con muchas aplicaciones biotecnológicas (Rutherford *et al.*, 2006).

El primer autotransportador descubierto, fue la proteasa IgA de *Neisseria gonorrhoeae* (Pohlner *et al.*, 1987). Estos autotransportadores comparten una organización distintiva, en 3 dominios principales:

- péptido señal (PS) Sec-dependiente (para su secreción);
- un dominio pasajero (o proteína madura a secretar); y
- un dominio C-terminal, también llamado unidad de translocación (TU) o dominio β , este último posee dos subdominios: un extremo C-terminal de 250-300 aa que forman el barril β que será insertado en la membrana externa y formará el poro, y una región de unión de 25 aa, que tomará una conformación de α -hélice y que forma el péptido conector o linker.

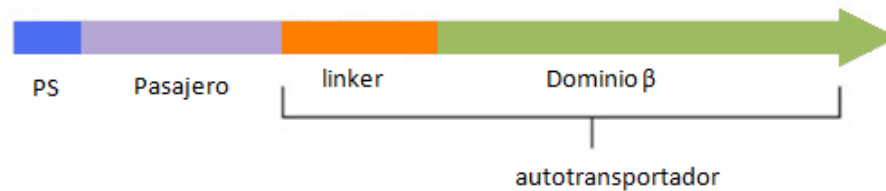


Fig.9 Estructura del precursor del autotransportador. Modificado de José, 2006.

Así, el mecanismo de translocación se encuentra conservado entre los diferentes autotransportadores, posee 4 pasos:

- translocación a través de la membrana interna;
- transporte periplásmico;
- inserción dentro y translocación a través de la membrana externa; y
- modificación y procesamiento del dominio pasajero; donde puede ser liberado o permanecer anclado (Rutherford *et al.*, 2006).

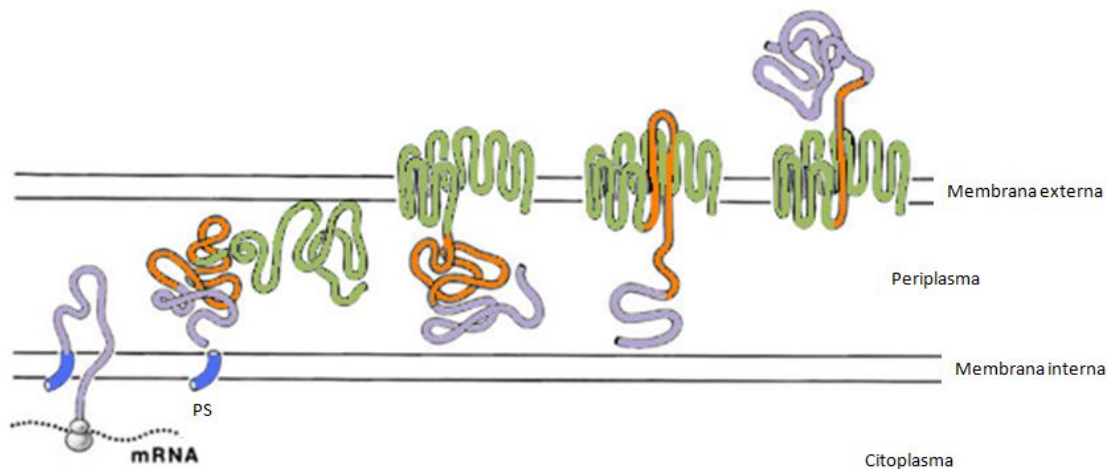


Fig.10 Mecanismo de secreción de los autotransportadores. Modificado de José, 2006.

Una vez que la proteína está en la superficie celular puede tener diferentes destinos. Por ejemplo, puede permanecer anclada y sobresalir de la superficie de la bacteria, como una larga poliproteína, o puede ser liberada del dominio β y después permanecer libre asociada a este o ser liberada al espacio extracelular.

Además, el uso de autotransportadores presenta muchas ventajas, en primer lugar la molécula expuesta en la superficie celular se encuentra accesible para cualquier tipo de unión o estudios de actividad sin la necesidad de un sustrato o factor de unión necesario para atravesar la membrana; además cuando es conectada a la matriz, en este caso la membrana externa celular, las proteínas han probado ser más estables que las moléculas libres; además de que la preparación o purificación de las moléculas para muchas aplicaciones es innecesaria ya que todas las moléculas de interés expuestas por la célula puede participar en reacciones o ensayos analíticos y después ser removidas por centrifugación.

En la tabla 3 se muestran ejemplos de proteínas recombinantes expresadas por la vía de autotransporte (José, 2006).

Tabla 3 Ejemplos de proteínas recombinantes y péptidos expresados en la superficie celular por autotransporte. Modificado de José, 2006.

Péptidos expresados	Aplicación	Referencias
Subunidad β de la toxina del cólera	Estudios de translocación	Maurer <i>et al.</i> , 1997 Maurer <i>et al.</i> , 1999
B-Lactamasa	Estudios de translocación	Lattermann <i>et al.</i> , 2000
Adrenodoxina bovina (Adx)	Síntesis de esteroides; Biocatálisis celular completa; Hidrólisis de ésteres	José <i>et al.</i> , 2001 José <i>et al.</i> , 2003
Aprotinina (inhibidor de la tripsina pancreática bovina, BPTI)	Estudios de unión de enzimas y estudios de translocación	José <i>et al.</i> , 2005
UreA y fragmentos (<i>H. pylori</i>)	Vacunas	Rizos <i>et al.</i> , 2003

2. OBJETIVOS

GENERAL:

Evaluar el efecto de la coexpresión de chaperonas moleculares en la producción de la enzima penicilino acilasa de *E. coli*.

PARTICULARES:

- Evaluar el efecto de la co-expresión de las chaperonas GroEL/GroES, DnaK/DnaJ y ClpB sobre la producción de la Penicilino Acilasa de *E. coli*.
- Construir vectores de la Penicilino Acilasa fusionada al autotransportador MisL de *Salmonella entérica*.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Cepas Bacterianas

En este trabajo se utilizó la cepa de *E. coli* JM101/pPA102 (Merino, 1992), que contiene el gen de la penicilino acilasa bajo el control del promotor *lac*, un origen de replicación para *E. coli* y el gen de la resistencia a kanamicina.

3.2 Plásmidos

Se utilizaron los plásmidos PA102, nirLTBspMisL, LNA2, EMR602, BB7250 y BB7246. Donde los dos primeros plásmidos fueron usados como DNA molde para amplificar el gen *pac* y el dominio β del autotransportador MisL respectivamente y los últimos 4 fueron fuente de las chaperonas DnaK-DnaJ, GroEL-GroES, ClpB, DnaK-DnaJ, GrpE y ClpB en ese orden y cuyas características se encuentran en la tabla 5.

3.3 Vectores

Se utilizaron los vectores de clonación:

1) pGEM®-T Easy: este vector, de Promega, se basa en la ligación de productos de PCR amplificados con polimerasas termoestables que generan extremos con residuos 3' terminales de adenina (A) (ej. *Taq Polimerasa*, *Tfl*, *Tht*, *Tli*, etc), al contar con una timina (T) 3' terminal en ambos extremos del vector, se genera un extremo cohesivo compatible con el del producto de PCR. En dicho vector se clonaron el gen *pac* y la construcción PAspPA.

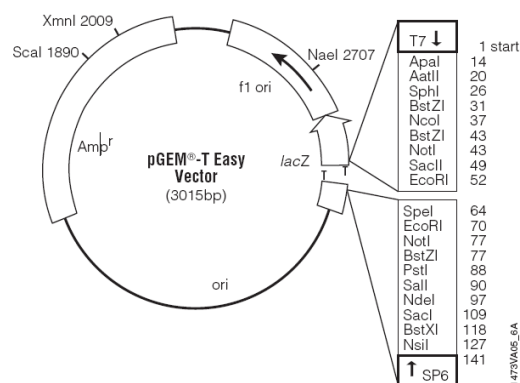


Fig.11 Mapa del vector de clonación pGEM®-T Easy. Se aprecian sus características principales, así como el sitio de clonación múltiple.

2) pCR4®Blunt-TOPO®: este vector, de Invitrogen, se basa en la actividad de la topoisomerasa para ligar genes con extremos romos provenientes de reacciones de PCR con enzimas de alta fidelidad (ej. Pfu, accuzyme, etc.). En este vector se clonaron el fragmento correspondiente al dominio β de MisL y el gen *pac* que será utilizado como control negativo.

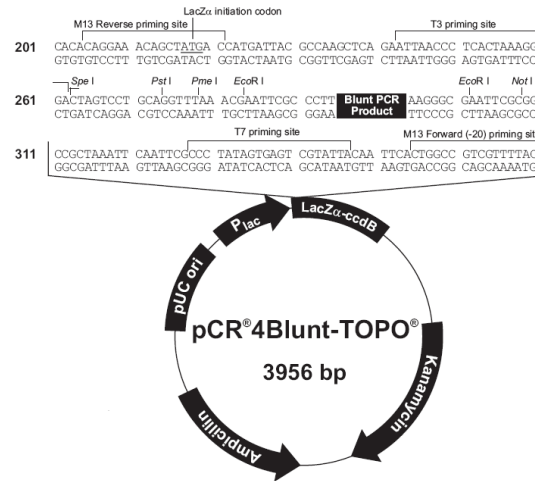


Fig.12 Mapa del vector de clonación pCR®4Blunt-TOPO®. Se muestran sus principales características.

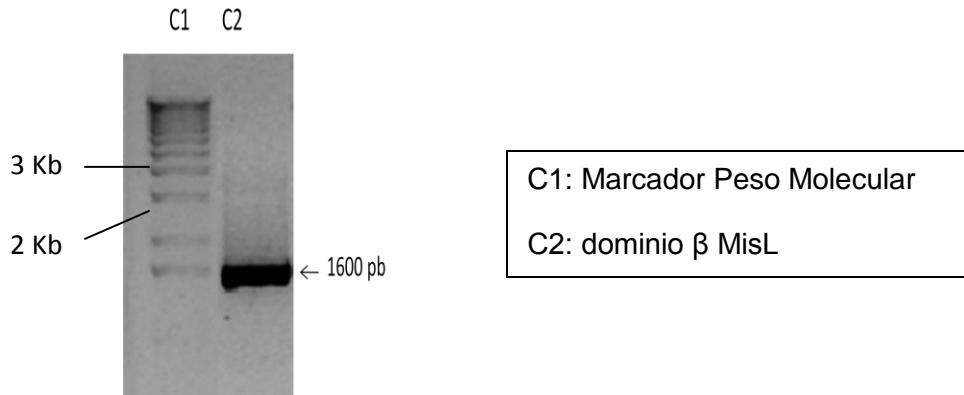
3.4 Construcción del vector de PA fusionado al autotransportador MisL

Se decidió usar el dominio β de MisL de *Salmonella typhimurium*, esto por su gran homología con el autotransportador AIDA-I de *E.coli*, el cual ha sido ampliamente utilizado en la expresión de proteínas recombinantes. (Kempis, 2001).

Se logró amplificar y clonar el gen *pac* de *E. coli*, tanto fusionado con el dominio β de MisL como sin este (como control negativo).

El gen del fragmento correspondiente al extremo C-terminal del autotransportador MisL obtenido por PCR con oligos específicos (Forward: GTGTTGCACGTTTCAGAGAaagcttCATGAAGATGGCGAACC, Reverse: gtcgacTCAGAACTGTATTTTCATCCC) se clonó en pCR®4Blunt-TOPO® (TOPO-MisL). Se encontraron colonias transformantes para la construcción antes mencionada y resultó positiva para el análisis de restricción con las enzimas HindIII y Sall, cuyos sitios de restricción fueron añadidos en los oligos específicos.

a)



b)

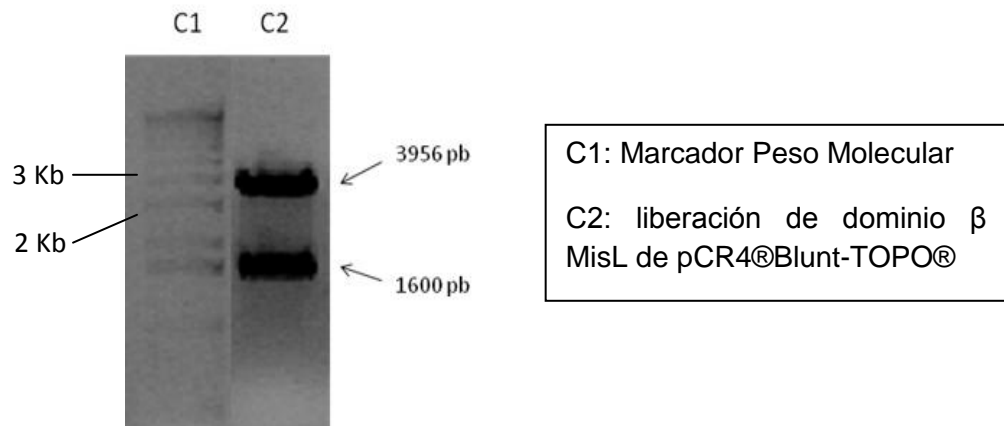
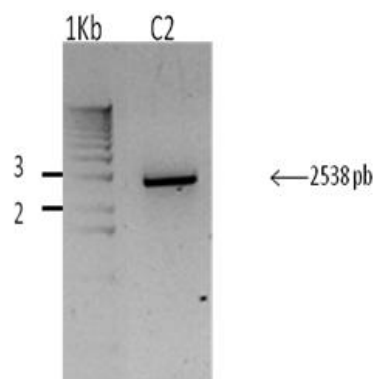


Fig.13 Amplificación por PCR y clonación del fragmento del dominio β de MisL. a) Amplificación por PCR del fragmento correspondiente al dominio β del autotransportador MisL b) Análisis por restricción con las enzimas *HindIII* y *Sall*, resultando positivo para TOPO-MisL.

Además, se logró amplificar por PCR y con oligos específicos (Forward: catatgAAAAATAGAAATCGTATGATCG, Reverse: TGGTTCGCCATCTTCATGaaagcttTCTCTGAACGTGCAACAC) el gen *pac* del plásmido pPA102. Dicho fragmento se clonó en pGEM®-T Easy y se obtuvieron colonias transformantes, las cuales fueron analizadas por restricción con las enzimas *NdeI* y *HindIII*, cuyos sitios fueron añadidos en los oligos específicos antes mencionados.

Este amplicón no posee codón de paro para que sea posible su ligación con el dominio β del autotransportador MisL.

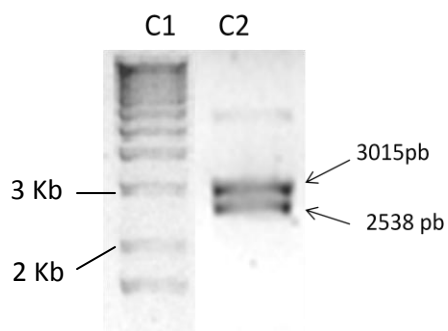
a)



C1: Marcador Peso Molecular

C2: PAspPA

b)



C1: Marcador Peso Molecular

C2: liberación de PAspPA de pGEM®-T Easy

Fig.14 Amplificación por PCR y clonación del gen *pac*. a) Amplificación por PCR del gen *pac* b) Análisis por restricción con las enzimas *NdeI* y *HindIII*, resultando una clona positiva.

Una vez que se clonaron los ADNc del gen *pac* así como al fragmento correspondiente del dominio β del autotransportador MisL, este último fue liberado del vector pCR4@Blunt-TOPO® y se ligó en el vector pGEM®-T Easy/PAspPA para obtener la construcción PAspPA-MisL en dicho vector. Se obtuvieron colonias transformantes y fueron analizadas por restricción con las enzimas *NdeI* y *Sall*, resultado una colonia positiva.

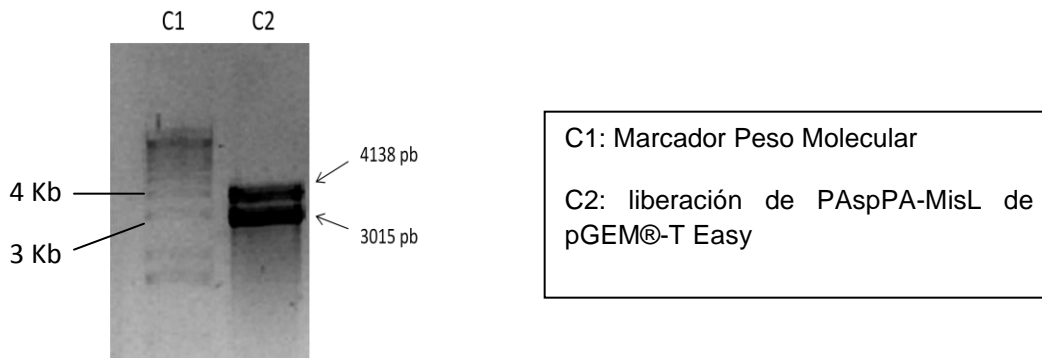


Fig.15 Clonación de la construcción PAspPA-MisL. Análisis por restricción con las enzimas *NdeI* y *Sall* resultando una clona positiva.

Referente al control negativo, se logró amplificar por PCR y con oligos específicos (Forward: catatgAAAAATAGAAATCGTATGATCG, Reverse: gtcgacTTATCTCTGAACGTGCAACAC) el gen *pac* del plásmido pPA102. Dicho fragmento se clonó en el vector pCR4®Blunt-TOPO® y se obtuvieron colonias transformantes, las cuales fueron analizadas por restricción con las enzimas *NdeI* y *Sall*, cuyos sitios fueron añadidos en los oligos específicos antes mencionados.

Este amplicón posee codón de paro para ser utilizado como control negativo en la evaluación de sistema de autotransporte.

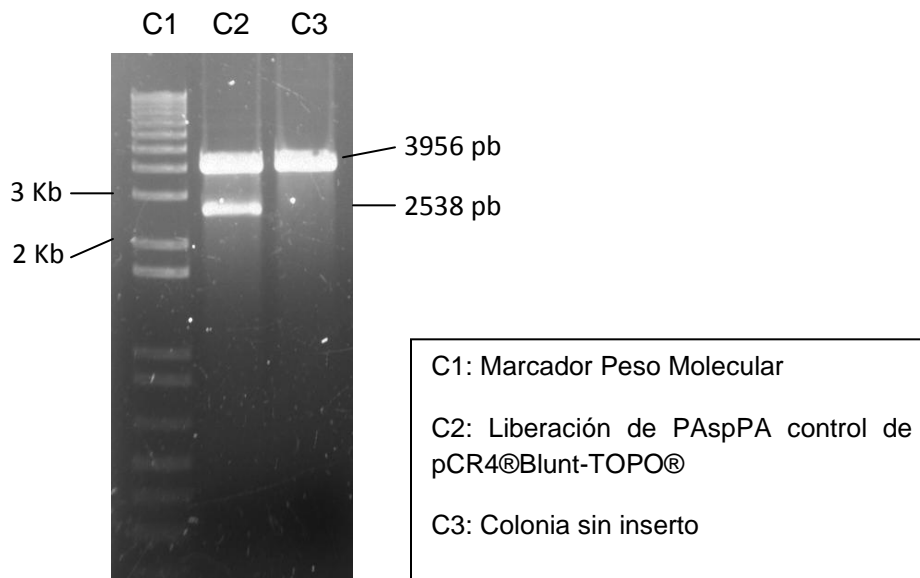


Fig.16 Clonación del amplicón del gen *pac*. Análisis por restricción con las enzimas *NdeI* y *Sall* resultando una clona positiva.

3.5 Medios de Cultivo

Los medios para conservación, propagación y cultivo se prepararon como se describe en los anexos B.1 y B.2.

3.6 Inóculos

El inóculo en todos los experimentos consistió en una azada de colonias aisladas de las placas con LB sólido y con los antibióticos correspondientes. Se inoculó 100 ml de medio BSG en un matraz de 250 ml y se incubó por 24 horas a 28°C y 200 rpm.

3.7 Conservación de las Cepas

Un liofilizado de la cepa *E. coli* JM101/pPA102, fue resuspendido en 100ml de medio LB suplementado con kanamicina (Kan) (25µg/ml) e incubado a 28°C y 200 rpm toda la noche para su recuperación. Una vez crecida la cepa, se alicuotó en glicerol y se almacenó a -80°C (Revco). A partir de este, la cepa se estrió sobre placas de LB/Kan y se incubaron a 28°C durante toda la noche; posteriormente fueron almacenadas a 4°C.

3.8 Aislamiento del plásmido pPA102

Se aisló el ADN plasmídico de la cepa *E.coli* JM101/pPA102 (Merino, 1992) y se corrieron geles de agarosa al 1% por electroforesis para corroborar la identidad del vector.

3.9 Tratamiento de Muestras

Durante el transcurso de los experimentos se tomaron muestras de 4 ml, las cuales se centrifugaron por 10 minutos a 6000 rpm en una centrifuga clínica. El sobrenadante se congeló y el pellet de células se resuspendió en 4 ml de buffer de fosfatos (pH 7.8) y se mantuvo en refrigeración para analizar actividad enzimática (no excedió de 24 horas para este análisis).

3.10 Determinación de Actividad enzimática de PA

Se llevó a cabo por el método del *p*-dimetilaminobenzaldehído (PDAB) (Balansingham, 1972), basado en la reacción colorimétrica del grupo carbonilo del PDAB con un grupo amino libre del 6-aminopenicilánico (6-APA) producto de la reacción de hidrólisis de la penicilina G por la PA.

El procedimiento fue el siguiente:

Se tomaron alícuotas de 900 µl de las muestras almacenadas a 4°C, las cuales se incubaron en tubos de ensayo de vidrio (100 mm x 13 cm) en un baño a 37°C durante 5 minutos. Después se añadieron 100 µl de una solución de penicilina G al 20% (anexo B.12) y se dejó reaccionar durante 10 minutos a 37°C. A los 10 minutos se tomaron 40 µl de la reacción y se transfirieron a un tubo eppendorf de 1.5 ml conteniendo 960 µl de etanol absoluto, esto para detener la reacción. Enseguida se agregaron 500 µl de la solución de PDAB, utilizando como blanco el buffer de fosfatos tratado de la misma manera que a las muestras. Este análisis se realizó dentro de las primeras 24 horas posteriores al experimento para evitar degradación o pérdida de actividad de la enzima.

Para realizar los cálculos de actividad enzimática se construyó una curva estándar (anexo C.1) a partir de diluciones conocidas del compuesto 6-APA en un buffer de fosfatos (pH 7.8), las cuales se procesaron con el método del PDAB y se leyó su absorbancia para relacionarla a la concentración de 6-APA de la dilución.

La actividad enzimática por mililitro de muestra (U/ml) se calcula de la siguiente manera:

$$\text{Actividad Enzimática} = \frac{(\text{D.O.} - b) (D) (1000)}{(m) (\text{PM 6-APA}) (t) (0.9 \text{ ml})} = \text{U/ml}$$

Donde:

D.O. = Densidad óptica de las muestras a 415 nm

b = Ordenada al origen de la curva estándar

m = Pendiente de la curva estándar

D = Dilución de la muestra

PM 6-APA = Peso molecular de 6-APA (216.24 mg/mmol)

t = Tiempo, en minutos, de la reacción muestra-sustrato (10 min)

0.9 = Fracción de la muestra analizada

U = Unidad de actividad enzimática, definida como la cantidad necesaria de la enzima para hidrolizar 1 µmol de penicilina G por minuto a 37°C.

3.11 Determinación de Proteína

Se empleó el método de Lowry (Lowry, 1951). Este se basa en la medición de la intensidad del color azul del compuesto producido por la reacción de Biuret entre

la proteína y el ión Cu^{+2} en condiciones alcalinas y a la reducción del reactivo fosfotúngstico – fosfomolibdico, conocido como Folin Ciocalteu, favorecida por la presencia de tirosina y triptófano en las proteínas.

Procedimiento:

1. Tomar 0.1 ml de las muestras tratadas de acuerdo a la sección 3.9 y aforar a 1 ml con agua destilada. Mezclar en vórtex.
2. Añadir 5 ml del reactivo D (anexo B.13), agitar y reposar 10 minutos.
3. Añadir 0.5 ml del reactivo de Folin (anexo B.14), agitar y reposar por 30 minutos.
4. Leer absorbancia a 590 nm contra un blanco de agua procesado de la misma manera.

Para la conversión de valores de densidad óptica en valores de concentración se utilizó la curva estándar B.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Efecto de la co-expresión de chaperonas

Se transformó la cepa JM101/pPA102 con los plásmidos que se indican en la tabla 4:

Tabla 4 Plásmidos utilizados y sus características

Nombre	Gen	Origen	Resistencia	Promotor	Inductor	Referencia
LNA2	dnaK- dnaJ	p15A	cloranfenicol	tac	IPTG	Bergès <i>et al.</i> , 1995
EMR602	groEL- groES	p15A	tetraciclina	tac	IPTG	Bergès <i>et al.</i> , 1995
BB7250	clpB	pSC101	cloranfenicol	P _{A1/laco-1}	IPTG	Tomoyasu <i>et al.</i> , 2001
BB7246*	dnaK- dnaJ- grpE- clpB	p15A y pSC101	cloranfenicol y espectinomina	P _{A1/laco-1}	IPTG	Tomoyasu <i>et al.</i> , 2001

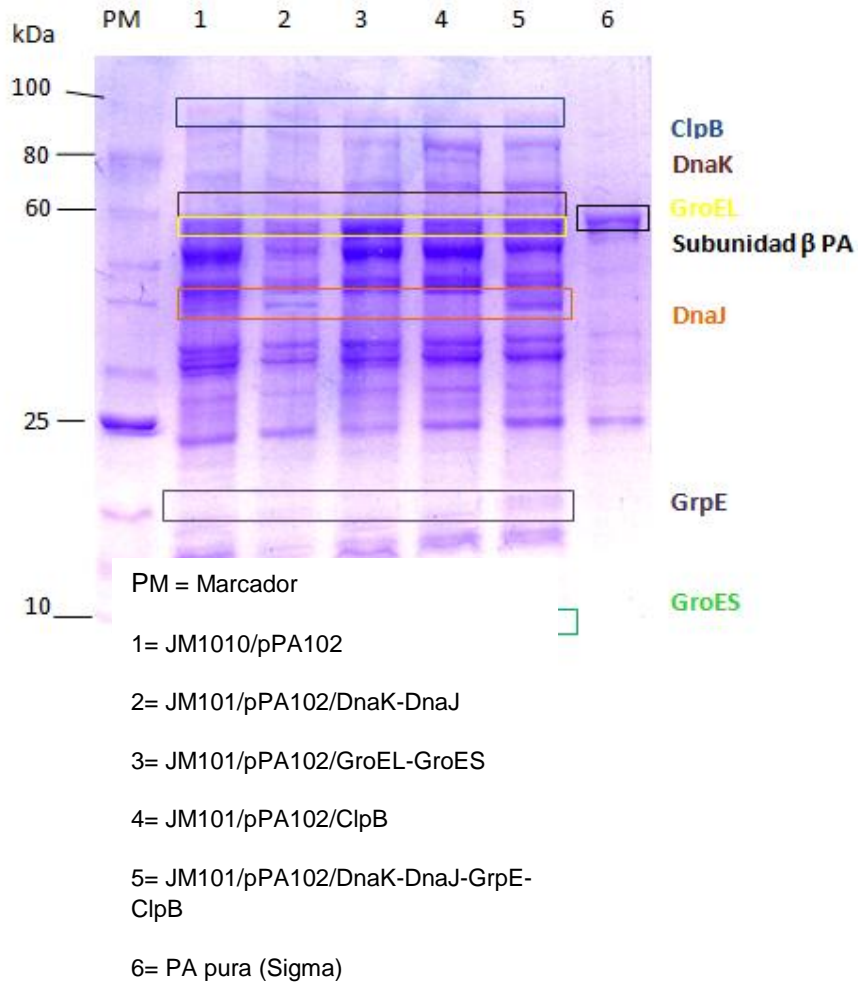
*Este plásmido se construyó con el plásmido BB535 (p15A ori, Spec^r, P_{a1/laco-1} *dnaK*, *dnaJ*) y el plásmido BB540 (pSC101 ori, Cm^r, P_{A1/laco-1} *grpE*, *clpB*).

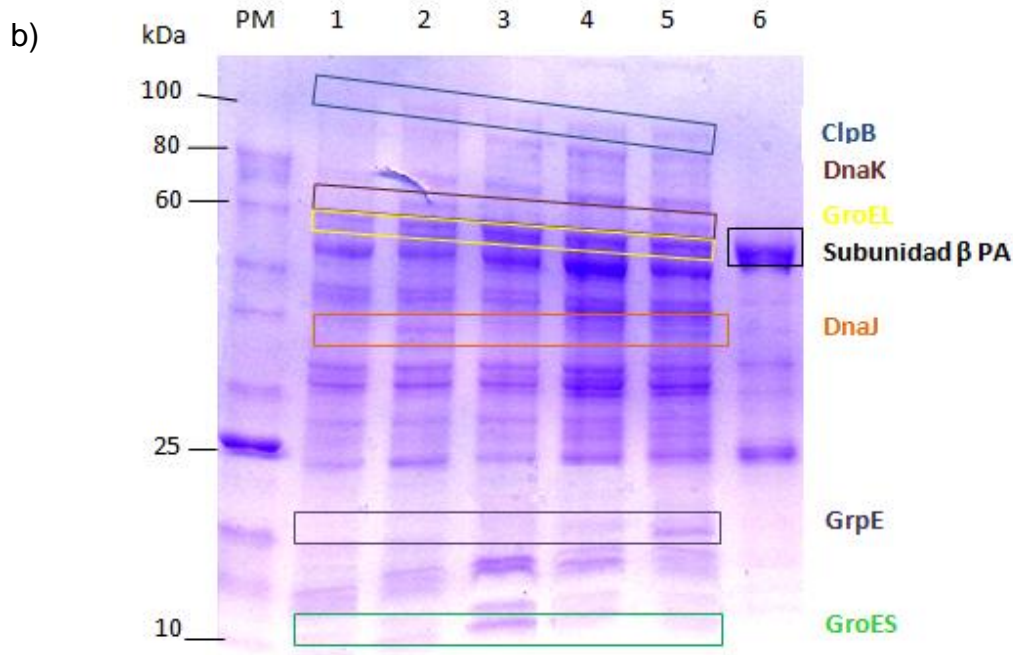
Además, a todas estas transformantes se les adicionó Kanamicina ya que el plásmido PA102 confiere esta resistencia.

La selección de colonias transformantes se realizó por crecimiento en medio de cultivo (LB líquido y sólido) con los respectivos antibióticos.

Se ha reportado que la PA se procesa postraduccionalmente en rangos de temperatura de 20-30°C (Spence and Ramsden, 2007), por lo que se llevaron a cabo ensayos de expresión a nivel de matraz a 28°C como temperatura de inducción, en donde las muestras que se tomaron, a 24 hrs y con las diferentes chaperonas fueron analizadas en geles de SDS-PAGE teñidos con Coomassie. Se relizaron experimentos utilizando galactosa como fuente de carbono e inductor de la PA (De León *et al.*, 2003), y para la expresión de algunas chaperonas se utilizó IPTG (25 µM).

a)





PM = Marcador

1= JM1010/pPA102

2= JM101/pPA102/DnaK-DnaJ

3= JM101/pPA102/GroEL-GroES

4= JM101/pPA102/ClpB

5= JM101/pPA102/DnaK-DnaJ-GrpE-ClpB

6= PA pura (Sigma)

Fig.17 Expresión electroforética en condiciones desnaturalizantes de la cepa recombinante JM101/pPA102 con las diferentes chaperonas. a) Se utilizó solo galactosa 5 g/l; b) Se utilizó galactosa 5 g/l e IPTG 25 μ M como inductores. Los cuadros muestran las bandas de las diferentes chaperonas: azul: ClpB (aprox 100 kDa); rojo oscuro: DnaK (70 kDa); amarilla: GroEL (60 kDa); naranja: DnaJ (41 kDa); morada: GrpE (23 kDa); verde: GroES (10 kDa); y negra: subunidad β de PA (62 kDa).

Al co-expresar **DnaK-DnaJ** bajo la inducción de IPTG, aumentó la actividad de PA un 33.3% mientras que al inducirse con galactosa solo aumentó 2.4% lo que corresponde con la figura 13 a y b, donde en esta última la banda correspondiente a estas chaperonas (70 y 41kDa respectivamente) se ven un poco más intensas.

Incluso Xu *et al.* (2005) lograron aumentar un 148% la actividad de PA sobreexpresando DnaK-DnaJ, aunque debe tomarse en cuenta que en dicho estudio se utilizó, además de IPTG, arabinosa como inductor y eliminaron el péptido señal de PAC, lo cual también afecta la exportación de esta enzima y por lo tanto no se favorece tanto la formación de cuerpos de inclusión.

En el estudio de Tomoyasu *et al.* (2001) se mostró que a 30°C DnaK-DnaJ suprimen la agregación de proteínas pero se requirieron niveles 4 veces mayores en comparación con la cepa wild type utilizada además de IPTG 250 µM.

Al co-expresar **GroEL-GroES** se obtuvo una actividad enzimática muy baja al inducirse tanto con IPTG como con galactosa (una disminución del 70.8% y 76.2% respectivamente). El pobre papel de esta chaperona para disolver agregados también ha sido observado por Tomoyasu *et al.* (2001) y Bergès *et al.* (1996). Inclusive en el estudio de Xu *et al.* (2005) se muestra que esta chaperona aumenta la solubilidad de proPAC pero no así su maduración, por lo que su actividad se ve muy disminuida. Lo que concuerda con nuestros datos mostrados en la tabla 4 y en la figura 14. Inclusive la cepa correspondiente a estas chaperonas muestra una disminución en la biomasa (Tabla 5) en contraste con las otras cepas que no mostraron diferencia significativa entre estas y la cepa control. Además las bandas de 60 y 10kDa (GroEL-GroES respectivamente) se muestran intensas (figura 13a) pero esto no se encuentra relacionado con la actividad enzimática.

Un ejemplo de este comportamiento lo muestra Bergès (1996) en su estudio donde co-expresa la interleucina 13 y el factor estimulador de colonias granulocitos-macrófagos fusionados a estas chaperonas (hIL-13-GroEL/ES y GM-CSF-GroEL/ES respectivamente) se retarda el crecimiento de la primera construcción y respecto a la segunda construcción evita de manera moderada la lisis celular que sigue a la inducción.

Tabla 5 Datos de la co-expresión de PA y las respectivas chaperonas.

Muestra (24 hrs)	Biomasa (mg/ml)
Control	0.89
Control IPTG	0.89
DnaK/J	0.61
DnaK/J IPTG	0.56

GroEL/ES	0.88
GroEL/ES IPTG	0.89
ClpB	0.89
ClpB IPTG	0.87
DnaK/J/GrpE, ClpB	0.86
DnaK/J/GrpE, ClpB IPTG	0.82

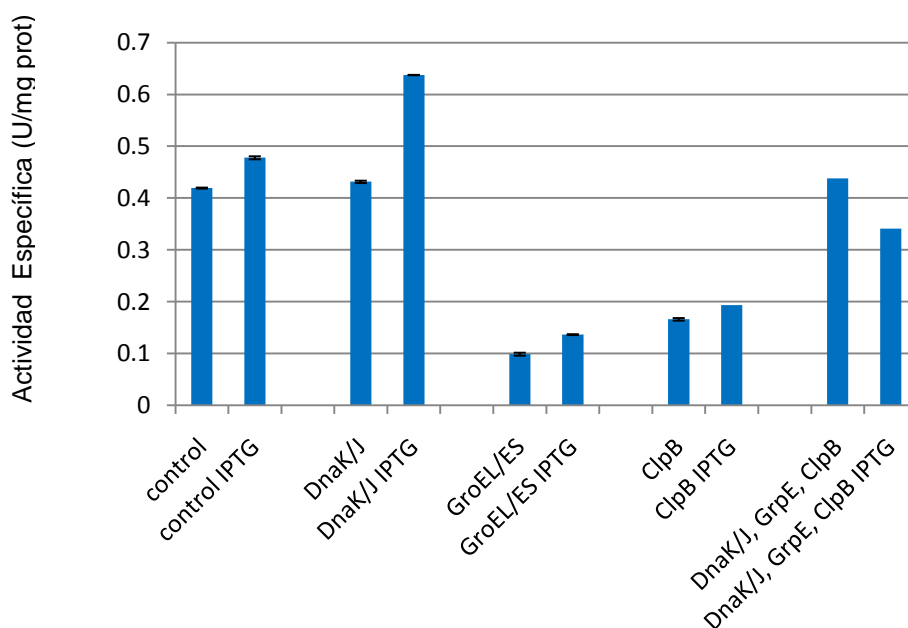


Fig.18 Relación de la Actividad Enzimática Específica (AE) en cada condición.

Al trabajar con **ClpB** (cuya banda corresponde a 100 kDa aprox), la actividad enzimática se ve disminuida tanto al ser inducida por IPTG como por galactosa, disminuyendo un 60.4% y 59.5% respectivamente.

Tomoyasu (2001) menciona que ClpB, inclusive a altos niveles (12 veces más que una cepa wild type) no es capaz de prevenir la agregación de proteínas pero en conjunto con DnaK ayudó a prevenir agregados de proteínas sin embargo se requirieron altos niveles de estas chaperonas (6 y 3 veces más, respectivamente, que una cepa wild type). Aunque también cabe mencionar que la actividad

enzimática no disminuyó tan drásticamente como en nuestro caso. Inclusive, la banda de esta chaperona (figura 13a, b, carril 4) no presenta gran diferencia de acuerdo a la correspondiente a la cepa transformada con DnaK-DnaJ-GrpE-ClpB (figura 13a, b, carril 5)

Al co-expresar **DnaK-DnaJ-GrpE-ClpB**, la actividad de PA aumenta un 4.8% al inducirse con IPTG pero disminuye un 29.2% al inducirse con galactosa.

Aunque varios estudios, entre ellos los realizados por Tomoyasu (2001) y Hoskins (2009), mencionan que ClpB en conjunto con el sistema DnaK presenta un papel sinérgico, nuestros datos no apoyan lo dicho por estos autores, incluso en la figura 13 a y b las bandas correspondientes a estas chaperonas (70, 41, 23 y 100kDa) se encuentran tenues.

4.2 Vectores PA y PA-MisL

Una vez que se tienen las construcciones en el vector de clonación, éstas se liberaron por digestión *NdeI*, y *Sall* ligando después dicho fragmento en transformó el vector pET-12a con cada construcción. Hecho esto, se obtuvo el vector pET-12a/PA y se espera corroborar pET-12a/PA-MisL.

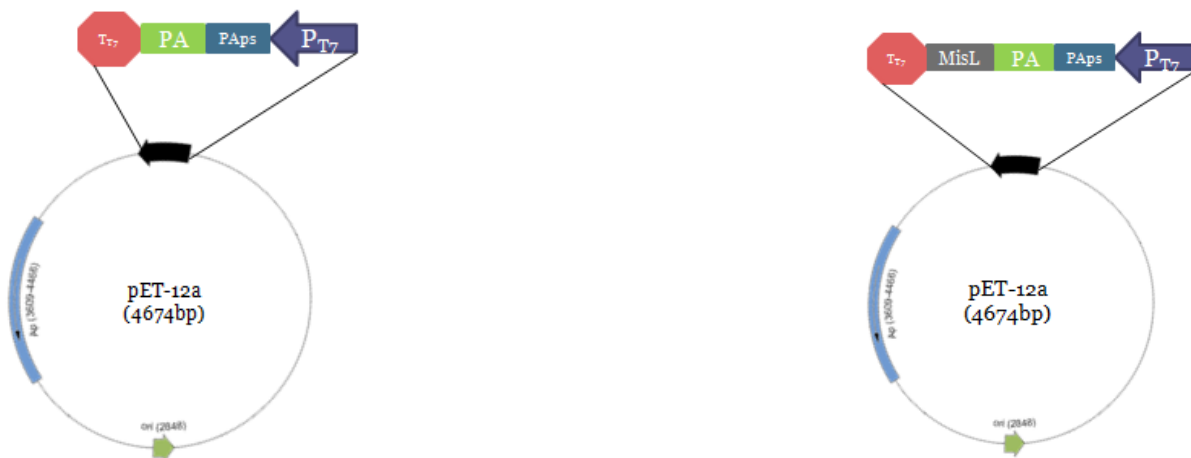


Fig. 19 Representación de los vectores de expresión.

5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

1. El sistema de chaperonas DnaK-DnaJ demostró ser más eficiente para aumentar la actividad de la PA, probablemente a que promueven la prevención de agregados proteicos además del correcto plegamiento de proteínas. Por lo tanto, el precursor de PA se procesa de manera correcta aumentando de esta manera su actividad enzimática.

2. En este trabajo, la sobreexpresión del sistema GroEl-GroES afectó negativamente tanto la producción de biomasa como la actividad enzimática, independientemente del inductor utilizado. Esto se debe posiblemente a un estrés producido por la sobreexpresión de dichas chaperonas e incluso a que el precursor de PA (92 kDa) alejado del rango de las proteínas que interactúan con el sistema GroEL-GroES (20-60 kDa).

3. Al expresar individualmente a ClpB se observa una disminución en la actividad de PA, debido probablemente a una degradación de la PA o de su precursor gracias a que pudiera verse favorecida su actividad de proteasa.

4. Se encontró que ClpB trabaja en conjunto con el sistema DnaK, mostrando una ligera mejora en la actividad de PA en comparación a la expresión de ClpB individualmente.

Se tiene como perspectivas evaluar el efecto de la coexpresión de las chaperonas SlyD y NapD, las cuales se ha demostrado ayudan al procesamiento de proteínas que se exportan por la vía Tat. Adicionalmente, como ya se cuenta con los vectores de expresión de la PA fusionada al autotransportador MisL, se pretende evaluar si este es capaz de transportar proteínas que requieren modificación postraducciona como es el caso de la PA.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acebrón, S. P., Fernández-Sáiz, V., Taneva, S.G., Moro, F. and Muga, A. (2008). DnaJ recruits DnaK to Protein Aggregates. *The Journal of Biological Chemistry* , 1381-1390.

Akoev, V., Gogol, E.P., Barnett, M.E. and Zolkiewski, M. (2004). Nucleotide-induced switch in oligomerization of the AAA+ ATPase ClpB. *Protein Science* , 13:567-574.

Altamarino, M.M., García, C., Possani, L.D. and Fersht, A. Oxidative refolding chromatography: folding of the scorpio toxin Cn5. *Nat Biotechnol* 1999;17:187-91.

Balansingham, K., Warburton, D., Dunnill, P. and Lilly, D. (1972). The isolation and kinetics of penicillin amidase from *E. coli*. *Biochem Biophys Acta* , 276:250-256.

Baneyx, F. and Mujacic, M. (2004) Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nature Biotechnology* , 22:1399-1408.

Bergès, H., Joseph-Liauzun, E. and Fayet, O. (1996). Combined Effects of the Signal Sequence and the Major Chaperone Proteins on the Export of Human Cytokines in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiologz* , 65:55-60.

Brannigan, J.A., Dodson, G., Duggelby, H.J., Moody, P.C., Smith, J.L., Tomchick, D.R. and Murzin, A.G. (1995) A protein catalytic framework with an N-terminal nucleophile is capable of self-activation. *Nature* , 378:416-419.

Bukau, B. and Horwich, A.L. (1998) The Hsp 70, Hsp60 machines. *Cell* , 92:351-66.

De León, A., Breceda, G.B., Barba de la Rosa, A.P., Jiménez-Bremont, J.F. and López-Revilla, R. (2003) Galactose induces the expression of penicillin acylase under control of the lac promoter in recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnology Letters* , 25:1397-1402.

De León, A., García, B., Barba de la Rosa, A.P., Villaseñor, F., Estrada A. and López-Revilla, A. (2003) Periplasmic penicillin G acylase activity in recombinant *Escherichia coli* cells permeabilized with organic solvents. *Process Biochemistry* , 39:301-305.

Doyle, S.M. and Wickner, S. (2009) Hsp104 and ClpB: Protein disaggregating machines. *Trends Biochem Sci* , 34:40-48.

Doyle, S. M., Hoskins, J.R. and Wickner S. (2007) Collaboration between the ClpB AAA+ remodeling protein and the DnaK chaperone system. *PNAS* , 27:11138-11144.

Fuganti, C., Graselli, P. and Casati, P. (1986) Immobilized penicillin acylase: application to the synthesis of the dipeptide aspartame. *Tetrahedron Letters* 27:3191-3194.

Gao, Y-G., Guan, Y-X., Yao, S-J. and Cho, M-G. On-column refolding of recombinant human interferon- γ with an immobilized chaperone fragment. *Biotechnol Prog* 2003;19:915-20.

Haslberger, T., Weibesahn, J., Zahn, R., Lee, S., Tsai, T.F., Bukau, B. and Mogk, A. (2007) M Domains Couple the ClpB Threading Motor with the DnaK Chaperone Activity. *Mol Cell* , 25:247-260.

Hoskins, J.R., Doyle, S.M. and Wickner, S. (2009) Coupling ATP utilization to protein remodeling by ClpB, a hexameric AAA+ protein. *PNAS* , 52:22233-22238.

Ignatova, Z., Hörnle, C, Nurk, A. and Kasche, V. (2002) Unusual Signal Peptide Directs Penicillin Amidase from *Escherichia coli* to the Tat Translocation Machinery. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. , 291:146-149.

Jhamb, K., Jawed, A. and Sahoo, D.K. (2008) Immobilized chaperones: A productive alternative to refolding of bacterial inclusion body proteins. *Process Biochemistry* , 43:587-597.

José, H. H. (2001). Functional display of active bovine adrenodoxin on the surface of *E. coli* by chemical incorporation of the [2Fe-2S] cluster. *ChemBiochem* , 2:695-701.

José, J. and Zangen, D. (2005) Autodisplay of the protease inhibitor aprotinin in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* , 333:1218-1226.

José, J. and Handel, S. (2003) Monitoring the cellular surface display of recombinant proteins by cysteine labeling and flow cytometry. *ChemBiochem* , 4:396-405.

José, J. (2006) Autodisplay: efficient bacterial surface display of recombinant proteins. *Appl Microbiol Biotechnol* , 69:607-614.

Kempis, Ma. del Rocío León. (2001). Utilización del Autotransportador MisL como vector de epítomos heterólogos en *Salmonella enterica*. Tesis Universidad Autónoma de México, Unidad Iztapalapa.

Kheirrolomoom, A., Ardjmand, M., Fazelina, H. and Zakeri, A. (2001) Clarification of penicillin G acylase reaction mechanism. *Proc. Biochem* , 1095-1101.

Lattermann, C.T., Maurer, J., Gerland, E. and Meyer, T.F. (2000) Autodisplay: functional display of active beta-lactamase on the surface of *Escherichia coli* by the AIDA-I autotransporter. *J Bacteriol* 182:3726-3733.

Lee, S. S. (2003). The structure of ClpB: A molecular chaperone that rescues proteins from an aggregated state. *Cell* , 115:229-240.

Lin, W. K. (2001). A biochemical engineering approach for enhancing production of recombinant penicillin acylase in *Escherichia coli*. *Bioprocess and Biosystems Engineering* , 24, 239-247.

Lowry, O. R. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* , 193:265-275.

Lu, J.Y., Lowe, D.A., Kennedy, M.D. and Low, P.S. (1999) Folate-targeted enzyme prodrug cancer therapy utilizing penicillin-V amidase and a doxorubicin prodrug. *J Drug Target* , 7(1):43-53.

Maurer, J., José, J. and Meyer, T.F. (1997) Autodisplay: one-component system for efficient surface display and release of soluble recombinant proteins from *Escherichia coli*. *J Bacteriol* , 179:794-804.

Maurer, J., José, J. and Meyer, T.F. (1999) Characterization of the essential transport function of the AIDA-I autotransporter and evidence supporting structural predictions. *J Bacteriol.* , 181:7014-7020.

Merino, E., Balbas, P., Recillas, F., Becerril B., Valle, F and Bolivar, F. (1992) Carbon regulation and the role in nature of the *Escherichia coli* penicillin acylase (pac) gene. *Mol Microbial* , 6:2175-2182.

Muronetz, V.I., Zhang, N.X., Bulatnikov, I.G. and Wang, C.C. Study on the interactions between protein disulfide isomerase and target proteins, using immobilization on solid support. *FEBS Lett* 1998;426(1):107-10.

Ng, J.S., Wang, P.T., Landis, B.H., Yonan, E.E. and Topgi, R.S. (2001) Method and apparatus for preparation of chiral beta-amino acids using penicillin G acylase. *International Patent Application US6214609 to Monsanto* .

Oinone, C. and Rouvinen, J. (2000) Structural comparison of Ntn-hydrolases. *Protein Science* , 2329-2337.

-
- Palmer, T., Sargent, F. and Berks, B.C. (2005) Export of complex cofactors-containing proteins by the bacterial Tat pathway. *Trends Microbiol* , 13(4):175-180.
- Phadtare, S., Fisher, M.T. and Yarbrough, L.R. Refolding and release of tubulins by a functional immobilized groEL column. *BBA* 1994;1208:189-92.
- Pohlner, J., Hater, R., Beyreuther, K. and Meyer, T.F. (1987) Gene structure and extracellular secretion of *Neisseria gonorrhoeae* IgA protease. *Nature* , 325(6103):458-462.
- Rajendhran, J., Krishnakumar, V. and Gunasekaran, P. (2002) Optimisation of a fermentation medium for the production of penicillin G acylase from *Bacillus sp.* *Lett. Appl. Microbiol.* , 35:523-527.
- Rizos, K., Lattemann, C.T., Bumann, D. Meyer, T.F. and Aebischer, T. (2003) Autodisplay: efficacious surface exposure of antigenic UreA fragments from *Helicobacter pylori* in *Salmonella* vaccine strains. *Infect Immun* , 71:6320-6328.
- Robinson, C. and Bolhuis, A. (2004) Tat-dependent protein targeting in prokaryotes and chloroplasts. *Biochimica et Biophysica Acta* , 135-147.
- Roche, D., Prasad, K. and Repic, O. (1999) Enantioselective acylation of β -amino esters using penicillin G acylase in organic solvents. *Tetrahedron Lett.* , 40,3665-3668.
- Rutherford, N. and Mourez, M. (2006) Surface display of proteins by Gram-negative bacterial autotransporters. *Microbial Cell Factories* , 5:22.
- Schlieker, C., Weibezahn, J., Patzelt, H., Tessarz, P., Strub, C., Zeth, K., Erbse, A., Schneider-Mergener, J., Chin, J.W., Schultz, P.G., Bukau, B. and Mogk, A. (2004) Substrate recognition by the AAA+ chaperone ClpB. *Nat Struct Mol Biol* , 11:607-615.
- Schumacher, G., Sizmann, D., Haug, H., Buckel, P. and Böck, A. (1986) Penicillin acylase from *E. coli*: unique gene-protein relation. *Nucleic Acids Research* , 14:5713-5727.
- Spence, D.W. and Ramsden, M. (2007) Penicillin Acylases. En P. J. A.P., *Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications* (págs. 583-597). Springer.
- Svedas, V.K., Savchenko, M.V., Beltser, A.I. and Garunda, F. (1996) Enantioselective penicillin acylase catalysed reactions. *Ann. NY Acad. Sci.* , 799,659-669.

Tomoyasu, T., Mogk, A., Langen, H., Goloubinoff, P. and Bukau, B. (2001) Genetic dissection of the roles of chaperones and proteases in protein folding and degradation in the *Escherichia coli* cytosol. *Molecular Microbiology* , 40:397-413.

Topgi, R.S., Ng, J.S., Landis, B., Wang, P. and Behling, J.R. (1999) Use of enzyme penicillin acylase in selective amidation/amide hydrolysis to resolve 3-amino-4-pentynoate isomers. *Bioorg. Med. Chem.* , 7,2221-2229.

Van Rantwijk, F., Sheldon, R.A., Vanlangen, L.M., Khimiouk, A.L., Guranda, D.T. and Svedas, V.K. (2002) Process for the preparation of enantiomerically enriched amines. *International Patent Application WO 02/20821 to DSM* .

Vrudhula, V.M., Senter, P.D., Fisher, K.J. and Wallace, P.M. (1993) Prodrugs of doxorubicin and melphalan and their activation by a monoclonal antibody-penicillin-G amidase conjugate. *J Med Chem* , 36(7):919-923.

Weibezahn, J., Tessarz, P., Schlieker, C., Zahn, R., Maglica, Z., Lee, S., Zentgraf, H., Weber-Ban, E.U., Dougan, D.A., Tsai, F.T.F., Mogk, A. and Bukau, B. (2004) Thermotolerance Requires Refolding of Aggregated Proteins by Substrate Translocation through the Central Pore of ClpB. *Cell* , 119:653-665.

Xu, Y., Weng, C., Narayanan, N., Hsieh, M., Anderson, W.A., Shcarer, J.M, Moo-Yung, M. and Chou, P. (2005) Chaperone-Mediated Folding and Maturation of the Penicillin Acylase Precursor in the Cytoplasm of *Escherichia coli*. *Applied Enviromental Microbiology* , 6247-6253.

ANEXOS

A. Protocolos

A.1 Amplificación por PCR con enzima de alta fidelidad Accuzyme.

Reactivo	Volumen μ l
Agua MQ estéril	17.30
Buffer de Accuzyme 10x	2.50
MgCl ₂ [50mM]	1.50
dNTP's [10mM]	0.30
Oligo Forward [10pmol/ μ l]	1.00
Oligo Reverse [10pmol/ μ l]	1.00
DNA molde [100ng]	1.00
Enzima Accuzyme [2.5U/ μ l]	0.40

Se inicia con 2 minutos de desnaturalización inicial a 94°C. Después se disminuye la temperatura a 48°C por 1 minuto (alineamiento de oligos) y en ese momento se añade 0.50 μ l de la enzima Accuzyme. Se continúa con los ciclos y condiciones normales de amplificación.

A.2 Adición de Adeninas

Se comienza con 1.7 ml de producto a PCR purificado, generado por una enzima de alta fidelidad (ej. Pfu, Accuzyme, etc). Después se añade 1 μ l del buffer de reacción 10X de la Taq DNA polimerasa, 0.50 μ l de MgCl₂ 25mM (a una concentración final de 0.2mM), 5 unidades de Taq DNA polimerasa y agua MQ estéril hasta alcanzar un volumen final de 10 μ l. Esta mezcla se incuba a 72°C por 15-30 minutos y se utiliza de 1-2 μ l en la reacción de ligación.

A.3 Células Rubidio Competentes

Se crece un preinóculo de la cepa necesaria en 5 ml de LB durante toda la noche a 37°C y 200 rpm. Se toma una muestra del preinóculo y se inocula en medio LB, comenzando con una OD de 0.1, se incuba a 37°C hasta alcanzar una OD de 0.5.

Este cultivo se transfiere a tubos de polipropileno previamente enfriados en hielo y se dejan reposar en hielo por 30 minutos, agitando de vez en cuando.

Después se centrifuga a 6000 rpm por 10 minutos a 4°C. Se decanta el sobrenadante y se resuspende suavemente el pellet celular en 20 ml de la solución RF1. Se incuba por 30 minutos y agitando de vez en cuando.

Después de esto, se centrifuga a 6000 rpm por 10 minutos a 4°C. Se decanta el sobrenadante y se añaden 500µl de la solución RF2 y se alicuotan en tubos eppendorf en volúmenes de 50 µl. Se almacena a -80°C.

A.4 Transformación de células rubidio competentes

Se descongelan en hielo un tubo eppendorf de las células rubidio competentes, a las cuales se les añade 50 ng de DNA plasmídico o el total del DNA proveniente de una reacción de ligación.

Esta mezcla se deja reposar en hielo por 30 minutos, agitando cada 10 minutos. Pasados estos 30 minutos, la mezcla se incuba a 42°C por un minuto e inmediatamente después se vuelve a poner en hielo por otro minuto.

Enseguida se añade 150 µl de medio SOC y se recuperan las células a 37°C por una hora a 750 rpm. Después se plaquean en cajas con LB.

A.5 Células Electrocompetentes

Se crece un preinóculo de la cepa necesaria en 5 ml de LBON durante toda la noche a 37°C y 200 rpm. Se toma una muestra del preinóculo y se inocula en medio LBON, comenzando con una OD de 0.1, se incuba a 37°C hasta alcanzar una OD de 0.5.

Este cultivo se transfiere a tubos de polipropileno previamente enfriados en hielo y se dejan reposar en hielo por 15 minutos.

Después se centrifuga a 6000 rpm por 10 minutos a 4°C. Se decanta el sobrenadante y se resuspende suavemente el pellet celular en glicerol al 10% frío y a tubo lleno. Esto se hace dos veces. Enseguida se tira el sobrenadante y se resuspende en 300 µl de glicerol al 10% frío y se alícuota en tubos eppendorf en volúmenes de 50 µl. Estas alícuotas se almacenan a -80°C.

A.6 Transformación células electrocompetentes

Se descongelan en hielo un tubo eppendorf de las células electrocompetentes, a las cuales se les añade 10-20 ng de DNA plasmídico o 5 µl total del DNA proveniente de fenolización.

Esta mezcla se deja reposar en hielo por 5 minutos. Pasado este tiempo, la mezcla se coloca en una celdilla y se coloca en el electroporador (1800 volts). Después del choque, la mezcla se pasa a 150 µl de medio SOC y se recuperan las células a 37°C por una hora. Después se plaquean en cajas con LB.

A.7 Fenolización

Una mezcla de ligación se lleva a un volumen de 100 μ l con agua MQ estéril. Enseguida se añaden 30 μ l de acetato de amonio 9 M pH 8.3 y se adiciona un volumen igual de fenol. Se mezcla y se centrifuga a 13000 rpm por 3 minutos.

Se transfiere la fase acuosa a un tubo eppendorf limpio y se añade 1 μ l de glicógeno 20 mg/ml y se mezcla. Enseguida se añade 250 μ l de EtOH absoluto frío, se mezcla y se incuba a -20°C por una hora. Pasado este tiempo, se centrifuga a 13000 rpm durante 10 minutos. Se descarta el sobrenadante y se añade 1 ml de etanol al 70%. Se repite este paso 2 veces y se quita el exceso de etanol con una micropipeta para después dejar secar a temperatura ambiente.

Una vez seca la pastilla se resuspende en 10 μ l de agua MQ estéril y se añaden 5 μ l de esta suspensión a una alícuota de células electrocompetentes.

A.8 Purificación de DNA plasmídico

Se inoculan 3 ml de medio de cultivo LB y se incuban toda la noche a 37°C y 200 rpm. De este cultivo se toma una alícuota de 1.5 ml y se coloca en un tubo eppendorf para centrifugarlo a 13000 rpm por 10 minutos.

Se desecha el sobrenadante y se resuspende el pellet en 100 μ l de la solución de lisis alcalina I. Enseguida se le agrega 200 μ l de la solución de lisis alcalina II (recién preparada), mezclando suavemente y dejando reposar 5 minutos en hielo.

Pasado este tiempo, se añade 150 μ l de la solución de lisis alcalina III, mezclándose por inmersión e incubando por 30 minutos en hielo para después centrifugar a 13000 rpm por 15 minutos.

Después se transfiere el sobrenadante a un tubo eppendorf limpio y se le añade un volumen igual (450 μ l aprox) de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico, se mezcla y se centrifuga a 13000 rpm por 7 minutos. Enseguida se transfiere la fase acuosa a un tubo eppendorf limpio y se añade 600 μ l de etanol al 70% frío y se deja incuban por 30 minutos a -20°C.

Luego de precipitar, se centrifuga a 13000 rpm por 10 minutos y la pastilla resultante se lava dos veces con 500 μ l de etanol al 70% frío y se deja secar a temperatura ambiente. Una vez seca la pastilla, esta se resuspende en 30 μ l de agua MQ estéril y se adicionan 2 μ l de RNasa 0.1 mg/ml y se incuba a 37°C por media hora.

Se analiza la integridad del DNA plasmídico en un gel de agarosa al 1%.

A.9 Geles de SDS-PAGE en gradiente

Se preparan las soluciones stock, de 4% y 20% de acrilamida. Una vez preparadas se les adiciona PSA y TEMED y se colocan dichas soluciones en una cámara de gradiente. Enseguida se vacía la primera capa entre dos vidrios especiales para la obtención de geles de 0.75mm de grosor y se cubre cuidadosamente con agua MQ (para linearizar).

Una vez gelificada la primera capa, se retira el exceso de agua, se coloca el peine y se añade la solución correspondiente al gel concentrador ya mezclada con PSA y TEMED. Ya que haya gelificado se retira el peine y se lavan los pozos con agua MQ y secándolos con papel filtro.

Se cargan las muestras y se corre el gel en buffer tris-glicina 1X, a 100 volts por aproximadamente 2.5 horas

B. Soluciones

B.1 Medio LB

Compuesto	g/l
Bacto triptona	10
Extracto de levadura	5
NaCl	10

Se disuelven en 1 litro de agua destilada y se ajusta el pH a 7.0 con NaOH. Se esterila en autoclave.

* Para LB sólido se adicionan 15 g/l de bactoagar.

B.2 Medio LBON

Compuesto	g/l
Bacto triptona	10
Extracto de levadura	5

Se disuelven en 1 litro de agua destilada y se ajusta el pH a 7.0 con NaOH. Se esterila en autoclave.

B. 3 Medio SOC

Compuesto	g/l
Triptona	20
Extracto de Levadura	5
NaCl	0.5

Se disuelven en 950 ml de agua destilada y enseguida se agrega 10 ml de KCl 250 mM. Después se ajusta el pH a 7 con NaOH y se esteriliza por autoclave. Una

vez estéril se deja enfriar y se agregan 10 ml de $MgCl_2$ 1M (esterilizado por autoclave) y 10 ml de glucosa 2M (esterilizada por filtración).

Una vez preparado se almacena a temperatura ambiente.

B.4 Solución de lisis alcalina I

Reactivos	Concentración
Tris-HCl (pH8)	25mM
EDTA	10 mM
Glucosa	10 mM

Se esteriliza por autoclave y se almacena a 4°C.

B.5 Solución de lisis alcalina II

Reactivos	Concentración
SDS	1%
NaOH	0.2 mM

Se prepara justo antes de usarse.

B.6 Solución de lisis alcalina III

Reactivos	Concentración
Acetato de Sodio	3M

Se ajusta el pH a 4.8 con ácido acético glacial y se esteriliza por autoclave. Se almacena a 4°C.

B.7 Solución RF1 (200 ml)

Reactivos	Cantidad
RbCl	2.4 g
$MnCl_4 \cdot 4H_2O$	1.98 g
$CaCl_2$	0.30 g
Glicerol	30 ml

Se ajusta a 200 ml con agua destilada y se esteriliza por autoclave. Después se añaden 6 ml de acetato de potasio 1M y se almacena a 4°.

B.8 Solución RF2 (200 ml)

Reactivos	Cantidad
RbCl	0.24 g
$CaCl_2$	2.2 g
Glicerol	30 ml

Se ajusta a 200 ml con agua destilada y se esteriliza por autoclave. Después se añaden 4 ml de MOPS 0.5 M y se almacena a 4°C.

B.9 Acetato de Potasio 1M pH 7.5

Se disuelven 0.98 g de acetato de potasio en 10 ml de agua destilada y se ajusta el pH a 7.5 con ácido acético. Enseguida se esteriliza por filtración.

B.10 MOPS 0.5 M pH 6.8

Se disuelven 0.052 g de MOPS en 5 ml de agua destilada y se ajusta el pH a 6.8 con NaOH. Enseguida se esteriliza por filtración.

B.11 TAE 50x

Reactivos	Cantidad
Tris (base)	242 g
Ácido acético glacial	57.1 ml
EDTA (0.5 mM, pH 8)	100 ml

Se afora a 1 litro con agua destilada.

B.12 Gel de agarosa 1%

Reactivos	Cantidad
Agarosa	0.4 g
TAE 1x	40 ml

Esta solución se calienta en el horno de microondas en nivel de potencia 2 durante 5 minutos.

B.13 Buffer de fosfatos (pH 7.8)

Se prepara con 42.5 ml de NaH_2PO_4 0.1 M y 457.5 ml de Na_2HPO_4 0.1 M. Se afora a 1 litro y se mide el pH con un potenciómetro.

B.14 Elementos Traza

Se preparan según la tabla a continuación mencionada. Una vez preparada se mantuvo en refrigeración. Una fracción de la solución se esterilizó a 121°C por 15 minutos y se mantuvo en refrigeración hasta su uso. Se recomienda agregar la solución de elementos traza al medio de cultivo hasta el momento de su uso con la finalidad de prevenir la precipitación de sales.

Compuesto	g/l
FeCl_3	2.7
ZnCl_2	2
$\text{CaCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	2
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	2
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	1
$\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	1
H_3BO_3	0.5

HCl conc	100 ml/l
----------	----------

B.15 Kanamicina (25mg/ml)

Se pesan 25mg de Kanamicina y se disuelven en 1 ml de agua MQ estéril. La solución así preparada se esteriliza en frío a través de un filtro millipore de 0.22 μm de diámetro de poro. La solución estéril debe mantenerse en refrigeración. Para obtener la concentración de trabajo (25 mg/ml) se adicionan 1 μl del preparado por ml de medio de cultivo.

B.16 Cloranfenicol (25 mg/ml)

Se pesan 25mg de Cloranfenicol y se disuelven en 1 ml de etanol absoluto. Esta solución debe mantenerse en refrigeración. Para obtener la concentración de trabajo se adicionan 1 μl del preparado por ml de medio de cultivo.

B.17 Espectinomicina (20 mg/ml)

Se pesan 20mg de Espectinomicina y se disuelven en 1 ml de agua MQ estéril. Esta solución se esteriliza en frío a través de un filtro millipore de 0.22 μm de diámetro de poro. La solución estéril debe mantenerse en refrigeración. Para obtener la concentración de trabajo se adicionan 1 μl del preparado por ml de medio de cultivo.

B.18 Tetraciclina (15mg/ml)

Se pesan 15mg de Tetraciclina y se disuelven en 1 ml de metanol absoluto. Esta solución debe mantenerse en refrigeración y protegida con papel aluminio ya que es sensible a la luz. Para obtener la concentración de trabajo se adicionan 1 μl del preparado por ml de medio de cultivo.

B.19 Solución de IPTG (100 mM)

Se pesan 0.2383 g de IPTG (Sigma), aforando a 10 ml con H₂O destilada y se esteriliza en frío a través de un filtro millipore de 0.45 μm . Para obtener una concentración de 25 μM en el medio de cultivo se adiciona 250 μl por cada litro de medio de cultivo.

B.20 Solución de PDAB

Se disuelve 1 g de PDAB en 50 ml de etanol al 60% (v/v), agregando después 0.5 ml de H₂SO₄ concentrado y aforando a 100ml con etanol 60% (v/v)

B.21 Penicilina al 20%

Se disuelven 0.2 g de penicilina G en 1 ml de buffer de fosfatos pH7.8.

B.22 Reactivo D (500ml)

Se mezclan 5 ml de la solución A y 5 ml de la solución B en 490 ml de la solución C. Se cubre con papel aluminio y se conserva a 4°C por hasta 3 meses.

Solución	Componentes
A	CuSO ₄ .5H ₂ O al 5%
B	KNaC ₄ H ₄ O ₆ .4H ₂ O al 1%
C	Na ₂ CO ₃ al 2% en NaOH 0.1N

B.23 Reactivo de Folin

Se hace una dilución 1:2 en agua destilada, se protege con papel aluminio y se almacena a 4°C. Se prepara antes de usarse.

B.24 Tiamina (0.1%)

Se pesan 0.01 g de tiamina (Sigma), aforando a 10 ml con H₂O destilada y se esteriliza con filtro millipore de 0.22 µm. La solución estéril debe mantenerse en refrigeración y al mes de su preparación debe ser reemplazada. Se adicionan 40 µl de la solución así preparada por cada litro de medio de cultivo.

B.25 Medio BSG

Compuesto	g/l
Glucosa	5
MgSO ₄ .7H ₂ O	1
(NH ₄) ₂ PO ₄	3.5
KH ₂ PO ₄	3.5
Tiamina	4 µg/l
Kanamicina	25 mg/l
Elementos traza	3 ml
IPTG	25 µM

Se disuelven la glucosa y el MgSO₄.7H₂O en 100 ml de agua destilada correspondiente al 10% del volumen total, las sales en el 90% del volumen total. Se esterilizan por autoclave, mientras que las soluciones de ampicilina y tiamina se esterilizan por filtración. Después de enfriarse se mezclan la fuente de carbono y las sales.

Para preparar el preinóculo se adicionan 5 g/l de extracto de levadura, esterilizada por autoclave.

B.26 Solución de Acrilamida al 4%

Reactivos	Cantidad (μl)
Acrilamida	365
Tris-HCl pH 8.8	690
SDS 10%	27.5
Agua MQ estéril	1650
TEMED	2.5
PSA	12

B.27 Solución de Acrilamida al 20%

Reactivos	Cantidad (μl)
Acrilamida	1815
Tris-HCl pH 8.8	690
SDS 10%	27.5
Agua MQ estéril	205
TEMED	1.5
PSA	12

B.28 solución de Acrilamida Concentrador

Reactivos	Cantidad (μl)
Acrilamida	132
Tris-HCl pH 6.8	252
SDS 10%	10
Agua MQ estéril	600
TEMED	2
PSA	7

B.29 Tris-HCl 1.5M, pH 8.8

Se pesan 18.2 g de Tris base y se disuelven en 50 ml de agua destilada. Se le ajusta el pH con HCl concentrado y se afora a 100 ml. Se esteriliza por autoclave y se almacena a temperatura ambiente.

B.30 Tris-HCl 0.5M, pH 6.8

Se pesan 1.5 g de Tris Base y se disuelven en 15ml de agua destilada. Se le ajusta el pH con HCl concentrado y se afora a 25ml. Se esteriliza por autoclave y se almacena a temperatura ambiente.

B.31 SDS 10%

Se disuelven 0.2 g de SDS en 20 ml de agua destilada. Se almacena a temperatura ambiente

B.32 Persulfato de Amonio (PSA) 10%

Se disuelven 20 mg de PSA en 200 μ l de agua destilada. De preferencia, se prepara al momento de usarlo.

B.33 Solución de Teñido (100ml)

Se disuelven 0.05g de azul de comassie en 50 ml de metanol, se agregan 10 ml de ácido acético y se adicionan 40 ml de agua destilada.

B.34 Solución de Desteñido (200ml)

Se mezclan 50 ml de metanol, 135 ml de agua destilada y 15 ml de ácido acético.

C. CURVAS ESTÁNDAR

C.1 Curva Estándar de Actividad enzimática de PA

Cada vez que se preparan soluciones nuevas debe realizarse una nueva curva patrón usando una solución de 6-APA (Sigma) de 2.5 mg/ml en PBS, pH 7.8, para ello, se efectúan diluciones seriadas como se muestra en la tabla B.1.

Tabla C.1 Curva estándar para determinación de actividad enzimática.

Tubo	1	2	3	4	5	Bco
Dilución 6-APA	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	-
6-APA (mg/ml)	1.25	0.625	0.3125	0.1563	0.0781	-
Alícuotas (μ l)	40	40	40	40	40	40
Etanol (μ l)	960	960	960	960	960	960
PDAB (μ l)	500	500	500	500	500	500
Buffer, pH7.8 (μ l)	-	-	-	-	-	40

Una curva de calibración típica se muestra en la figura C.1.

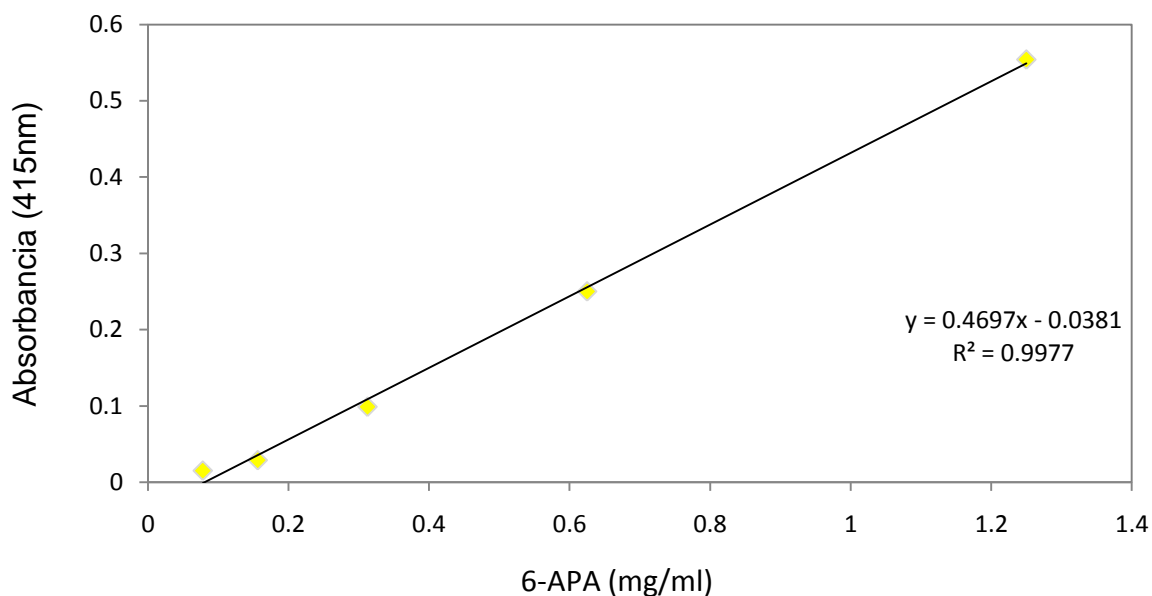


Figura C. 1 Curva estándar de actividad enzimática.

C.2 Curva Estándar de Proteínas

Se preparó una solución patrón de albúmina bovina sérica (BSA) de 1.4 mg/ml, a partir de la cual, se prepararon y procesaron diferentes estándares, tal como se indica en la tabla C.2.

Tabla C.2 Curva estándar para determinación de proteínas.

Tubo	Bco	1	2	3	4	5
BSA (µl)	0	25	50	75	100	125
H ₂ O dest. (µl)	1000	975	950	925	900	875
Reposar 10 minutos						
Reactivo D (ml)	5	5	5	5	5	5
Reposar 30 minutos						
Reactivo de folin (µl)	500	500	500	500	500	500

Una curva de calibración típica se muestra en la figura B.2.

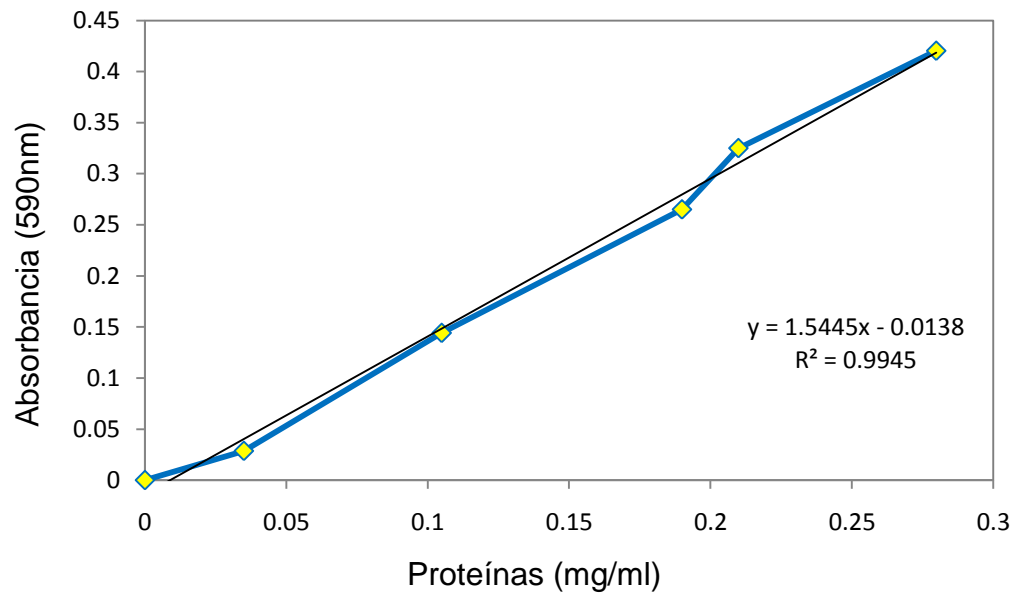


Figura C.2 Curva estándar de proteínas.