



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

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

**"Producción y caracterización de proteínas de interés
biotecnológico en *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli*."**

Tesis que presenta

M. C. Juan Antonio Rojas Contreras

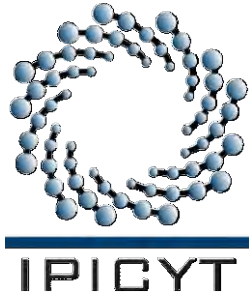
Para obtener el grado de

Doctor en Ciencias en Biología Molecular

Director de la Tesis:

Dr. Antonio De León Rodríguez

San Luis Potosí, S.L.P., Junio de 2012



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**Producción y caracterización de proteínas de interés biotecnológico en *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli***” presentada para obtener el Grado de Doctor en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **M. C. Juan Antonio Rojas Contreras** y aprobada el **22 de Junio de 2012** 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.

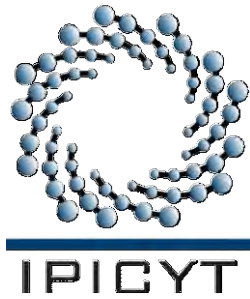
Dr. Antonio de León Rodríguez
(Director de la tesis)

Dr. Mario Pedraza Reyes
(Miembro del Comité Tutorial)

Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa
(Miembro del Comité Tutorial)

Dr. Alejandro de las Peñas Nava
(Miembro del Comité Tutorial)

Dra. Luz Maria Teresita Paz Maldonado
(Miembro del Comité Tutorial)



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Bioingeniería y Biotecnología Molecular de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del doctor Antonio De León Rodríguez.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología No. 204213 y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C. Se recibió financiamiento parcial del Proyecto CONACyT Básicas 82010.

Dedicatorias

Dedico este trabajo y el esfuerzo puesto en el, a mi familia.

Mi esposa **Norma**

Mi hijo **Carlos Antonio** y

Mi hija **Yunuen Carolina**

LOS AMO.

Agradecimientos

Agradezco enormemente al Doctor Antonio De León Rodríguez por permitirme realizar este proyecto de tesis doctoral en su laboratorio, por su asesoría, enseñanzas y paciencia.

Al Doctor Mario Pedraza Reyes del IIBE en Guanajuato por todo su apoyo.

A la Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa por las facilidades prestadas en su laboratorio para la realización de este trabajo de tesis.

Al M. en B. Leandro Gabriel Ordóñez por su valioso apoyo para la realización de esta tesis y sus consejos técnicos.

A los Doctores Alejandro de las Peñas Nava y Luz María Teresita Paz Maldonado por sus comentarios y su rápida revisión.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el otorgamiento de la beca No. 204213 para realizar mis estudios de doctorado en el IPICYT.

Al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, por haber brindado los recursos necesarios para mi formación profesional.

A mis amigos del laboratorio 4: Luis Manuel Rosales (luillo), Gabriel Ordoñez (negrito), Nahomy Marino, Fabiola León Galván (faby), Gabriela Vázquez (gaby vajque), Hera Andrade, Zazil Donaxí (chachil) y Mabel.

A todos los que forman parte del IPICYT, porque participaron directa o indirectamente en la realización de mi proyecto de tesis doctoral.

Contenido

	Página
Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Acta de examen	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Lista de tablas	xii
Lista de figuras	xv
Anexos	xviii
Resumen general	xx
General abstract	xxi

	Página
Capítulo I. Producción y secreción de hIL-2 e IFN-γ en <i>B. subtilis</i>.	1
Resumen	2
Abstract	3
1. Marco teórico	4
1.1. La interleucina-2 humana (hIL-2)	4
1.2. El interferón gamma humano (hIFN-γ)	4
1.3. <i>B. subtilis</i> como modelo de estudio	5
1.4. Fabricas bacterianas	6
1.4.1. <i>B. subtilis</i> como fábrica de proteínas	7
1.5. Introducción a la secreción de proteínas	8
1.5.1. Clasificación de proteínas en <i>Bacillus subtilis</i>	8
1.5.2. Péptidos señal	10
1.5.3. Clasificación de los péptidos señal	11
1.5.3.1. Péptidos señal secretorios (tipo-Sec)	11
1.5.3.2. Péptidos Señal de Lipoproteínas	12
1.5.3.3. Péptidos Señal Doble Arginina (tipo-RR)	12
1.5.3.4. Péptidos Señal tipo-Pseudopilina	15
1.5.3.5. Péptidos Señal de Feromonas y Bacteriocinas	15
1.5.4. Señales de Retención	16
1.6. Componentes Pre-translocacionales accesorios	16
1.7. Ruta de la Partícula de Reconocimiento de la Señal	18
1.8. Translocasa Sec	20
1.9. Peptidasas señal Tipo I	22
1.10. Catalizadores del plegamiento	23
1.11. Proteasas Extracelulares	24
1.12. Factores de control de calidad y estrés de secreción	25
1.13. Replicación y conservación de los plásmidos en <i>B. subtilis</i>	28
2. Objetivos	29
2.1 Objetivo general	29
2.2 Objetivos específicos	29

	Página
3. Materiales y Métodos	30
3.1. Estrategia Experimental	30
3.2. Cepas bacterianas y plásmidos	31
3.3. Extracción de ADN y procedimientos de transformación bacteriana	31
3.4. Construcción de los plásmidos de expresión	31
3.4.1. Construcción de un vector integrativo para la producción de hIL-2 en <i>Bacillus subtilis</i>	31
3.4.2. Construcción de un vector replicativo para la producción de hIL-2 en <i>Bacillus subtilis</i>	32
3.4.3. Construcción de los vectores replicativos para la producción de hIFN-γ en <i>Bacillus subtilis</i>	33
3.4.4. Construcción del vector integrativo para la producción de hIFN-γ en <i>Bacillus subtilis</i>.	34
3.5. Expresión de hIFN-γ	35
3.6. Detección de proteínas mediante Western blot y ELISA	36
4. Resultados y Discusión	38
4.1. Construcción de los vectores para la expresión de hIL-2	38
4.1.1. Construcción del vector integrativo pInt-il2	38
4.1.2. Construcción del vector autoreplicativo pSpac-il2	41
4.2. Construcción de los vectores para la expresión de hIFN-γ	43
4.2.1. Construcción del plásmido replicativo pSpac-gam	45
4.2.2. Construcción del plásmido replicativo pRep-gam	47
4.2.3. Construcción del plásmido replicativo pInt-gam	48
4.3. Producción de hIFN-γ usando los plásmidos replicativos e integrativos en <i>B. subtilis</i>	49
5. Conclusiones	55
6. Referencias	56
Anexos	69

	Página
Capítulo II. Caracterización enzimática y modelamiento molecular de una superóxido dismutasa de <i>Deschampsia antarctica</i> E. Desv, producida en <i>E. coli</i>	83
Resumen	84
Abstract	85
1. Introducción	86
2. Marco teórico	86
2.1. Radicales libres y especies reactivas de oxígeno	87
2.1.1. Radical superóxido	88
2.1.2. Peróxido de hidrógeno	89
2.1.3. Radical hidroxilo	90
2.1.4. Oxígeno singulete	91
2.2. Clasificación de las sod	93
2.2.1. Hierro SODs	94
2.2.2. Manganeseo SODs	95
2.2.3. Cobre-zinc SODs	96
2.3. Estructura de la Cu-Zn Superóxido dismutasa	97
2.4. Mecanismo de acción de las Cu- Zn SODs	101
2.5. Producción de proteínas recombinantes en <i>E. coli</i>	103
2.5.1. <i>Escherichia coli</i> BL21-SI	104
2.6. El sistema pET	104
2.7. Etiquetado de proteínas con 6His	105
2.7.1. Cromatografía de afinidad de metal inmovilizado (IMAC)	105
2.7.2. Níquel, cobalto y cobre	106
3. Objetivos	108
3.1. Objetivo General	108
3.2. Objetivos específicos	108

	Página
4. Materiales y métodos	108
4.1. Medios de cultivo	108
4.2. Cultivo en Lote	108
4.3. Purificación de DaSOD	109
4.4. Detección de la 6His DaSOD por Western blot	110
4.5. Actividad enzimática de la DaSOD	111
4.6. Modelamiento de la DaSOD y análisis de la presencia de iones metálicos	111
4.7. Métodos Analíticos	112
4.8. Pruebas de inhibición de DaSOD	113
4.9. Efecto de la temperatura sobre la actividad de la DaSOD	113
5. Resultados y Discusión	114
5.1. Análisis de la secuencia de DaSOD y Modelamiento	114
5.2. Expresión, inmunodetección y purificación de DaSOD recombinante	119
5.3. Caracterización enzimática de DaSOD	121
5.4. Determinación de temperatura y pH óptimos	123
5.5. Termoestabilidad de la DaSOD	125
5.6. Determinación de parámetros cinéticos	126
6. Conclusiones	127
7. Perspectivas	128
8. Referencias	129
Anexos	135

Lista de tablas Capitulo 1

	Página
Tabla 1. Algunas proteínas recombinantes producidas en <i>B. subtilis</i>	6
Tabla 2. Cepas y plásmidos usados en este estudio	34
Tabla 3. Resumen de la preferencia de codones en <i>Bacillus subtilis</i>	44
Tabla A1. Medio LB	69
Tabla A2. Medio A base 10x	69
Tabla A3. <i>Bacillus</i> Sales 10x	69
Tabla A4. Medio A	69
Tabla A5. Medio B	70
Tabla A6. Solución I para purificar ADN plasmídico	70
Tabla A7. Solución II para purificar ADN plasmídico	70
Tabla A8. Solución III para purificar ADN plasmídico	70
Tabla A9. TAE 50X	70
Tabla A10. Gel de agarosa al 1%	71
Tabla A11. Soluciones requeridas	71
Tabla A12. Soluciones para el gel de gradiente	71
Tabla A13. Soluciones para el gel concentrador	71
Tabla A14. Soluciones para el gel de gradiente	72
Tabla A15. Amortiguador de corrida	72
Tabla A16. Amortiguador de transferencia <i>Towbin</i>	72
Tabla A17. Amortiguador de fosfatos (PBS)	72
Tabla A18. Solución para bloquear	72
Tabla A19. Amortiguador para la enzima fosfatasa alcalina	73

Tabla A20. Solución de anticuerpos policlonales primarios	73
Tabla A21. Solución de anticuerpos policlonales secundarios	73
Tabla A22. Mezcla de reacción para la PCR	73
Tabla A23. Programa usado para la amplificación de los fragmentos sp-amyL, hIL-2, hIFN-γ, p43	73

Lista de tablas Capítulo 2

	Página
Tabla 1. Análisis de la presencia de iones metálicos en DaSOD	122

Lista de figuras Capítulo 1

	Página
Figura 1. Trafico de Proteínas en <i>Bacillus subtilis</i>	9
Figura 2. Clasificación de los péptidos señal N-terminal	14
Figura 3. Dominios conservados en las proteínas de la familia SRP-GTPasa	19
Figura 4. Componentes involucrados en el exportación de proteínas Sec-dependientes en <i>B. subtilis</i>	21
Figura 5. Representación esquemática de la respuesta a estrés Csx-dependiente	27
Figura 6. Diagrama de la estrategia experimental	30
Fig. 7. Fusión por PCR del péptido señal de la alfa amilasa y la hIL-2 por overlapping extension	39
Figura 8. Construcción del plásmido pAXIL2 (clonación de la fusión <i>amyL-hiL2</i> en pAX01)	40
Figura 9. Construcción del plásmido plnt-il2	40
Figura 10. Representación esquemática del evento de doble recombinación homóloga conducente a la integración de la construcción del plásmido plnt-il2 en el locus <i>lacA</i> de <i>B. subtilis</i>	41
Figura 11. Estrategia usada para la construcción del plásmido pSpac-il2	42
Figura 12. Análisis mediante western blot de la producción de hIL-2 por la cepa <i>B. subtilis</i> WB600 conteniendo el plásmido pSpac-il2	43
Figura 13. Alineamiento de la secuencia nucleotídica del gen hIFN- γ silvestre y del gen sintético optimizado utilizado en este trabajo	44
Figura 14 A. Representación esquemática de la fusión por overlapping extension del péptido señal <i>spamyL</i> y el <i>hIFN-γ</i>	45
Figura 14 B. Análisis electroforético de la amplificación mediante PCR del péptido señal <i>spamyL</i>	45

Figura 15A. Representación esquemática de la construcción del plásmido pSpac-gam	46
Figura 15 B. Análisis electroforético de la construcción pSpac-gam	46
Figura 16 A. Región regulatoria del gen <i>cdd</i> de <i>B. subtilis</i>	47
Figura 16 B. Representación esquemática del plásmido pRep-gam	47
Figura 16 C. Análisis de restricción del plásmido pRep-gam con las enzimas <i>EcoRV</i> y <i>HindIII</i>	47
Figura 17 A. Representación esquemática de plnt-gam	48
Figura 17 B. Análisis de restricción del plnt-gam con las enzimas <i>BamHI</i>-<i>NotI</i>	48
Figura 17 C. Representación esquemática del evento de doble recombinación homóloga entre el casete flanqueado por los brazos 5' y 3' del gen <i>lacA</i> contenido en el plásmido plnt-gam y el cromosoma de <i>B. subtilis</i>	48
Figura 18. Cinéticas de crecimiento y producción de hIFN-γ por las diferentes cepas de <i>B. subtilis</i> WB600 cultivadas en medio 2xL-Mal	51
Figura 19. Inmunodetección del hIFN-γ en la pastilla celular de distintas cepas de <i>B. subtilis</i> WB600 al tiempo máximo de producción	52
Figura 20. Inmunodetección del hIFN-γ en el medio de cultivo de <i>B. subtilis</i> WB600/pRep-gam	53

Lista de figuras Capítulo 2

	Página
Figura 1. Localización de las distintas SODs en las células de plantas	93
Figura 2. Secuencia conservada, plegamiento, y regiones estructurales y funcionales de Cu,ZnSOD, eucarióticas	99
Figura 3. Estructura esquematizada del sitio activo de las Cu, ZnSOD	100
Figura 4. Potencial electrostático mapeado en la superficie de la estructura cristalina de ApSODH ₂ O ₂ de <i>Alvinella pompejana</i>	102
Figura 5. Modelos en 3D de las Cu/Zn SOD de <i>Deschampsia antártica</i>	115
Figura 6. Gráfico Anolea de evaluación del modelo predicho	116
Figura 7. Estructura de DaSOD. Cada monómero está conformado por una estructura de barril compuesto por ocho cadenas y siete loops	117
Figura 8. Sobreimposición de DaSOD y PaSOD	118
Figura 9. Análisis de la producción en biorreactor de DaSOD inducida por NaCl en <i>E. coli</i>	120
Figura 10. Inmunodetección con anti-His ₆ de la DaSOD recombinante purificada	120
Figura 11. Análisis de la pureza de la DaSOD mediante SDS-PAGE teñido con plata	121
Figura 12. Determinación de la actividad de DaSOD en gel	122
Figura 13. Temperatura óptima de actividad de DaSOD	123
Figura 14. Actividad <i>in situ</i> de la DaSOD A -20°C	124
Figura 15. Análisis del efecto del pH sobre la actividad de DaSOD	124
Figura 16. Análisis de la termoestabilidad de la DaSOD	125
Figura 17. Inhibición de la fotorreducción del NBT contra el aumento de la concentración de DaSOD purificada	126

Anexos Capítulo 1

	Página
Anexo 1 Medios y soluciones	69
Anexo 2 Métodos estándar	74
Anexo 3 Publicación del trabajo de investigación	76

Anexos Capítulo 2

	Página
Anexo 1 Purificación por cromatografía de afinidad (Ni-NTA, Invitrogen)	135
Anexo 2 Cuantificación de proteínas por el método de Lowry	136

Resumen general

“Producción y caracterización de proteínas de interés biotecnológico en *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli*.”

El descubrimiento continuo de nuevas vacunas y terapias nos invita al desarrollo de sistemas más eficientes para la producción de proteínas, enzimas y metabolitos. La elección de un hospedero adecuado y condiciones de producción óptimas son cruciales para el ulterior procesamiento de un producto con interés biotecnológico y/o de grado farmacéutico. *Escherichia coli* y algunas especies del genero *Bacillus* son los procariotes más frecuentemente utilizados para la producción industrial de proteínas recombinantes. Estos organismos se ven favorecidos sobre otros, debido a que su cultivo en sistemas de producción a gran escala y altas densidades celulares es fácil y generalmente barato. Por lo que, en el presente trabajo se realizó la expresión heteróloga de dos citocininas que poseen gran aplicación en biomedicina, como lo son, la hIL-2 y el hIFN- γ , utilizando como modelo la bacteria Gram positiva *B. subtilis* y además, se efectuó la caracterización bioquímica y bioinformática, de una superóxido dismutasa psicrófila producida en *E. coli*, proveniente del pasto antártico *Deschampsia antártica* E. Desv, cuyas condiciones de desarrollo extremas lo hacen un modelo idóneo para la búsqueda de actividades enzimáticas que pueden tener gran aplicación en la industria alimentaria, cosmética y farmacéutica.

Producción y caracterización de proteínas de interés biotecnológico en *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli*. PALABRAS CLAVE: *B. subtilis*, *E. coli*, péptido señal, proteína recombinante, ERO, antioxidantes, extremofilos.

General abstract

The continuous discovery of new vaccines and therapies invites us to develop more efficient systems for the production of proteins, enzymes and metabolites. The choice of a suitable host and optimal production conditions are crucial for the further processing of a biotechnological and/or pharmaceutical grade product. *Escherichia coli* and some species of the genus *Bacillus* are the most frequently used prokaryotes for the industrial production of recombinant proteins. These organisms are favored over others, because their culture in large scale systems and high cell densities is generally easier and economical. So, in this work, we report the heterologous expression of two cytokines that have wide application in biomedicine, as they are, the hIL-2 and hIFN- γ , using as a model the Gram-positive bacterium *B. Subtilis*, and also, the biochemical and bioinformatics characterization of a psychrophilic superoxide dismutase produced in *E. coli*, from the grass *Deschampsia antarctica* E. Dev, whose extreme growing conditions make it a suitable model to search for enzymatic activities that may have wide application in the food, cosmetic and pharmaceutical industries.

Production and characterization of proteins of biotechnological interest in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. KEY WORDS: signal peptide, recombinant protein ROS, antioxidant, extremophiles.

Capítulo I.

Producción y secreción de hIL-2 e IFN- γ
en *B. subtilis*.

Resumen

“Producción y secreción de interleucina 2 e interferón gamma humanos en *Bacillus subtilis*”

En el presente estudio se utilizó la bacteria Gram positiva *Bacillus subtilis* para la expresión y secreción al medio de cultivo de dos proteínas recombinantes de alto valor agregado como lo son la interleucina 2 (hIL-2) y el interferón gamma humanos (hIFN- γ). Para lograr los objetivos, se construyeron dos tipos de vectores bacterianos basados en los plásmidos pAX01 y pDG148 que permiten la expresión de los genes de interés dentro de *B. subtilis*, mediante su integración o replicación, respectivamente. La producción de bajas cantidades de hIL-2 (2 mg L⁻¹), se logró mediante la transformación de *B. subtilis* con un plásmido replicativo que dirige la transcripción de los genes bajo el promotor Pspac, mientras que no se detectó hIL-2 en las cepas transformadas con el plásmido integrativo. La producción máxima de interferón- γ humano (hIFN- γ) en el citoplasma de *B. subtilis* se obtuvo utilizando un vector replicativo que permite la expresión de los genes bajo el control del promotor fuerte constitutivo p43 del gen *cdd* de *B. subtilis*. Aunque la producción total de la citocinina fue de 20 mg L⁻¹, solo un 10 % de la proteína se secretó al medio de cultivo, lo que indica una rápida saturación del sistema de secreción de *B. subtilis* por la proteína recombinante producida. Con base en los resultados anteriores se concluyó que los plásmidos construidos en el presente trabajo permiten la expresión de hIL-2 e hIFN- γ , sin embargo, es necesario superar los “cuellos de botella” que presenta el sistema de secreción de *B. subtilis* para ampliar su uso en la producción de proteínas con intereses farmacéuticos. Por último se sugiere que la cepa que produce hIFN- γ podría ser utilizada como un probiótico funcionalizado para la liberación de la citocinina en el tracto gastrointestinal para el tratamiento de cáncer de colon y otras enfermedades.

Producción y secreción de interleucina 2 e interferón gamma humanos en *Bacillus subtilis*. PALABRAS CLAVE: *B. subtilis*, péptido señal, proteína recombinante, proteasas, probióticos.

Abstract

“Production and secretion of interleukin 2 and human gamma interferon in *Bacillus subtilis*”

In this study we used the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis* for the expression and secretion into the culture medium of two recombinant proteins with high added value such as interleukin 2 (hIL-2) and human gamma interferon (hIFN- γ). To achieve this objective, we constructed two types of bacterial vectors based on plasmids pDG148 and pAX01 that allowed the expression of target genes by genomic integration or autonomous replication in *Bacillus subtilis*, respectively. Production of low amounts of hIL-2 (2 mg L^{-1}), was achieved by transformation of *B. subtilis* with a replicative plasmid that directs transcription of genes under the Pspac promoter, whereas no hIL-2 was detected in the strains transformed with the integrative plasmid. Higher amounts of human interferon- γ (hIFN- γ) were produced in the cytoplasm of *B. subtilis* using a replicative vector that allows expression of genes under the control of the strong constitutive promoter p43 of *B. subtilis*. Although the total production of cytokine was 20 mg L^{-1} , only 10% of the protein was secreted into the culture medium, indicating a rapid saturation of the secretion system by the recombinant protein produced. Based on the above results it was concluded that the plasmids constructed in this study allow the expression of hIL-2 and hIFN- γ , however, is necessary to overcome "bottlenecks" that presents the secretion system of *B. subtilis* to extend its use in the production of proteins with pharmaceutical interest. Finally it is suggested that the strain producing hIFN- γ could be used as a probiotic functionalized to release the cytokine in the gastrointestinal tract for the treatment of colon cancer and other diseases.

Production and secretion of interleukin 2 and human gamma interferon in *Bacillus subtilis*. KEY WORDS: *B. subtilis* signal peptide, recombinant protein, proteases, probiotic.

1. Marco teórico

1.1. Interleucina-2 humana

En 1976 Morgan et al. descubrieron una glicoproteína capaz de inducir el crecimiento en cultivos de linfocitos T aislados de médula ósea humana. A esta glicoproteína se le denominó factor de crecimiento de células T o interleucina-2 humana (hIL-2) (Bubeník, 2004). La hIL-2, es una citocinina que tiene un peso molecular de 15.3 kDa, constituida por 133 aminoácidos. Las células T secretan la proteína madura que se encuentra glicosilada. Esta glicosilación no es necesaria para su actividad biológica y su función se desconoce. La hIL-2 es una citocinina que estimula el crecimiento de los linfocitos T activados, aumenta la respuesta inmune mediante la activación de otras células de la fórmula blanca como son los, linfocitos T citotóxicos, linfocitos B y células naturales asesinas, por tal motivo, se administra a pacientes con carcinoma renal metastático, melanoma maligno avanzado, leucemia aguda mieloblástica, trasplante de médula ósea y en el tratamiento de pacientes con SIDA (Malek y Gutgsell, 1993).

1.2. El interferón gamma humano (hIFN- γ)

El hIFN- γ es una citocinina inmunomoduladora involucrada en un amplio rango de actividades biológicas. Es una glicoproteína de 143 residuos aminoacídicos con una masa molecular de 20~25 kDa producida por los linfocitos T CD4 y CD8, así como por las células NK activadas. El hIFN- γ recombinante (rhIFN- γ) producido en *E. coli* es una proteína no glicosilada de 16.7 kDa, sin embargo permanece activa fisiológicamente (Khalilzadeh et al, 2003). El rhIFN- γ ha sido aprobado para el tratamiento de osteopetrosis maligna y granulomatosis crónica (Madyastha et al, 2000; Marciano et al, 2004). Adicionalmente, ensayos clínicos indican su eficacia terapéutica contra carcinoma renal, cáncer de colon y fibrosis pulmonar idiopática (Bajwa et al, 2005; Schroder et al, 2004). Las aplicaciones terapéuticas potenciales del hIFN- γ han aumentado el interés en el desarrollo de nuevos sistemas más eficientes para su producción y purificación.

1.3. *Bacillus subtilis* como modelo de estudio

B. subtilis es una bacteria bacilar, no patógena, aerobia, móvil, formadora de endosporas, comúnmente encontrada en el suelo y en asociación con plantas. Es bien conocida por su alta capacidad de secreción, el desarrollo de competencia natural y su habilidad para esporular (Dubnau, 1991; Fahnestock & Fisher, 1986; Palva, 1982; Stragier & Losick, 1996). La habilidad para responder con flexibilidad a un medio ambiente cambiante es esencial para la supervivencia bacteriana, al respecto, *B. subtilis* responde a cambios ambientales y a distintos tipos de agresiones mediante programas de adaptación. Estos incluyen un proceso de diferenciación celular dando lugar a la formación de una spora resistente a ambientes desfavorables (Moir et al, 1994; Stragier & Losick, 1996) y la captación de DNA (competencia) ya sea para conservarlo vía recombinación homóloga o, si este no posee suficiente homología, para utilizarlo como nutriente (Dubnau, 1991). Ambos fenómenos están acoplados a redes complejas de vías regulatorias y puntos de control del desarrollo (Grossman, 1995). Por otra parte, *B. subtilis* produce enzimas degradativas, tales como proteasas, lipasas, glicosil hidrolasas, levansacarasa, β -glucanasas, DNasas, y RNasas como respuesta adaptativa a la limitación de nutrientes. Entonces, las macromoléculas son degradadas por estas enzimas y los productos son internalizados por sistemas especiales localizados en la membrana citoplasmática (Priest, 1977; Simonen & Palva, 1993). En la competencia por nutrientes *B. subtilis* también secreta péptidos antimicrobianos y antifúngicos (antibióticos, lantibióticos, y bacteriocinas) para eliminar otros organismos (Duitman et al, 1999; Paik et al, 1998; Zheng et al, 1999). El genoma circular de 4,214-kb de *B. subtilis* 168 ha sido secuenciado completamente (Kunst et al, 1997). Se ha encontrado que este codifica cerca de 4100 posibles proteínas de las cuales más del 60 % tienen una función desconocida. Su sistema de transformación natural bien desarrollado es invaluable para su manipulación genética, además, *B. subtilis* es fácilmente manejable para su cultivo en el laboratorio.

1.4. Fabricas bacterianas

Las bacterias Gram-negativas y Gram-positivas son comúnmente utilizadas en la industria para la producción de proteínas, ya que los métodos utilizados para la obtención de un producto (proteínas, enzimas, metabolitos, etc.) en sistemas bacterianos son relativamente baratos. Las proteínas y metabolitos que pueden ser producidos por diferentes especies de *Bacillus* comprenden por ejemplo, enzimas, vitaminas e insecticidas (Tabla 1) (Westers et al, 2004). Esta lista muestra claramente que con *B. subtilis* no siempre se logra obtener un nivel de producción alto de las proteínas de interés. Por consiguiente, la optimización bacteriana para alcanzar un alto rendimiento del producto debe ser un proceso continuo que debe enfocarse en los aspectos que jueguen un papel importante en la producción.

Tabla 1. Algunas proteínas recombinantes producidas en *B. subtilis*

Producto	Rendimiento	Referencia
α -amilasa (AmyQ)	1– 3 g/L	(Palva, 1982)
Proinsulina	1 g/L	(Olmos-Soto & Contreras-Flores, 2003)
Lipasa A	600 mg/L	(Lesuisse et al, 1993)
Estreptavidina	35-50 mg/L	(Wu & Wong, 2002)
hEGF	7.0 mg/L	(Lam et al, 1998)
hIFN- α 2	0.5-1 mg/L	(Palva et al, 1983)
hIL-3	100 mg/L	(Westers et al, 2006)
hIFN- γ	20 mg/L	(Este estudio)

1.4.1. *B. subtilis* como fábrica de proteínas

Las especies de *Bacillus* poseen una gran capacidad para secretar proteínas directamente en el medio de cultivo (Simonen & Palva, 1993) lo que resulta en la separación natural del producto final de los componentes celulares. Esto además de simplificar el procesamiento de la proteína de interés, puede proveer mejores condiciones de plegamiento comparado con el ambiente reductor del citoplasma (Moks et al, 1987).

El uso de *B. subtilis* para la producción de productos alimenticios y farmacéuticos se ve altamente favorecido sobre el uso de *E. coli*, ya que *B. subtilis* es considerado como un organismo GRAS (generalmente reconocido como seguro). En contraste a *E. coli*, *B. subtilis* no produce exotoxinas, las cuales son pirogénicas en humanos y otros mamíferos por lo que tienen que ser removidas y complican el proceso de purificación (Petsch & Anspach, 2000). En la industria, cerca del 60% de las enzimas disponibles comercialmente se producen por especies de *Bacillus*, por ejemplo proteasas para detergentes y amilasas usadas en la industria de procesamiento del almidón (Palva, 1982; Simonen & Palva, 1993). La mayoría de las proteínas secretadas al medio de cultivo son endógenas de *Bacillus*, sin embargo, hasta el momento ninguna de las proteínas terapéuticas comerciales es producida por este organismo.

El uso de las especies de *Bacillus* para la producción de biofarmacéuticos de origen eucariótico es a menudo severamente impedido como resultado de varios embotellamientos que se presentan durante el proceso de secreción, tales como una pobre señalización hacia el translocón, degradación de la proteína secretada, y un plegamiento post-traducciona incorrecto. Los análisis genómicos y proteómicos facilitados por la disposición de la secuencia completa del genoma de *B. subtilis* (Kunst et al, 1997) han incrementado el conocimiento sobre las rutas de secreción y sus posibles substratos (Antelmann et al, 2001; Tjalsma et al, 2004; van Dijl et al, 2002). La explotación adecuada de este conocimiento podría en un futuro cercano resultar en un uso más amplio de *B. subtilis* como hospedero para la producción de proteínas farmacéuticas.

1.5. Introducción a la secreción de proteínas

En bacterias, la mayoría de las proteínas destinadas a dejar el citoplasma son exportadas mediante la altamente conservada ruta Sec. Rutas de exportación de proteínas más especializadas son utilizadas para la secreción de un subgrupo específico de proteínas extracelulares. Los principios básicos del transporte de proteínas a través de las membranas, como se describe enseguida, aplica para la mayoría de los organismos eucariotes y procariotes (Economou, 1998; Pohlschroder et al, 1997; Riezman, 1997; Schatz & Dobberstein, 1996; Tjalsma et al, 2000). La mayoría de las proteínas exportadas son sintetizadas como precursores con un péptido señal N-terminal (von Heijne, 1990b; von Heijne, 1998). Estos péptidos señal contienen información acerca del destino final que tendrán las proteínas y la maquinaria de transporte que debe ser utilizada para alcanzar dicho destino (von Heijne, 1998). Los precursores son reconocidos primero por factores de marcaje citoplásmicos solubles que dirigen su transporte hacia la maquinaria de translocación en la membrana celular. En seguida, el péptido señal es transportado mediante una translocasa, un canal proteínico en la membrana. Finalmente, el péptido señal es removido, lo que resulta en la liberación de la proteína madura de la membrana. Dependiendo de la naturaleza de la señal de transporte, y la presencia o ausencia de señales de retención, estas proteínas son retenidas en la membrana (Tjalsma et al, 1999a), o liberadas de la membrana debido al procesamiento por peptidasas señal especializadas (SPasas) (Dalbey et al, 1997). Cuando la proteína es translocada en un estado desplegado, esta se pliega a su conformación final después de pasar por la translocasa.

1.5.1. Clasificación de proteínas en *B. subtilis*

Aunque *B. subtilis* posee una estructura celular simple, las proteínas pueden por lo menos ser liberadas a, o retenidas en, cinco locaciones celulares (o subcelulares): el citoplasma, la membrana citoplasmática, la interface membrana-pared celular, la pared celular y el medio de cultivo (Tjalsma et al, 2000). Como se describe en la

Figura 1, el destino final de una proteína es definida por la presencia o ausencia de péptidos señal y/o señales de retención. Casi todas las proteínas de *B. subtilis* que carecen de señales de transporte son retenidas en el citoplasma en una forma plegada, con o sin la ayuda de chaperonas, en su conformación nativa. Otras proteínas contienen dominios transmembranales requeridos para su inserción en la membrana citoplasmática. La mayoría de las proteínas que son completamente transportadas a través de la membrana citoplasmática son sintetizadas con péptidos señal N-terminales. Como *B. subtilis* carece de membrana externa, muchas de estas proteínas son secretadas directamente al medio de cultivo. Otras proteínas exportadas involucradas en procesos tales como la formación de la pared celular, unión de substratos, o el plegamiento y modificación de proteínas secretorias translocadas, tienen que ser retenidas en la interface membrana-pared celular para cumplir su función. En las siguientes secciones se describirán, los péptidos señales, rutas de translocación, y componentes accesorios que actúan antes o después de la translocación, que se sabe están involucradas en la clasificación de proteínas en *B. subtilis*.

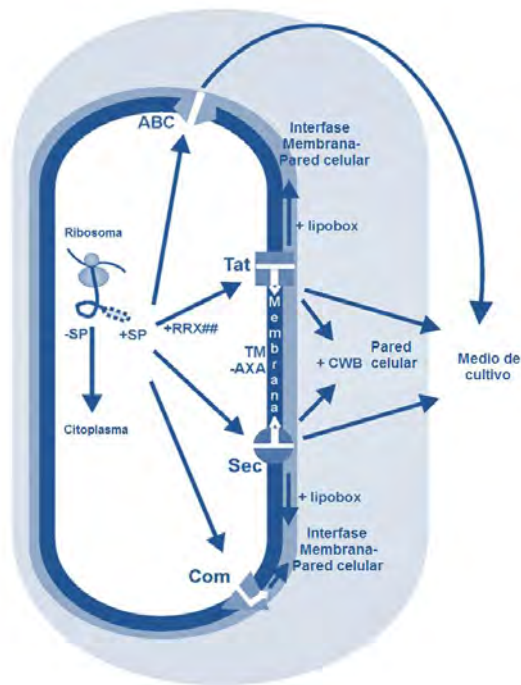


Figura 1. Trafico de Proteínas en *Bacillus subtilis*.

Las proteínas recién sintetizadas por los ribosomas pueden ser dirigidas hacia diferentes compartimentos de la célula dependiendo de la presencia (+SP) o ausencia (-SP) de un péptido señal N-terminal, y señales de retención específicas. El péptido señal en el N-terminal de las proteínas que serán transportadas mediante la vía Tat, contiene un motivo RR (RRX##). Las proteínas que carecen de un péptido señal permanecen en el citoplasma. Las proteínas con uno o más segmentos transmembranales (TM), y que carecen de un sitio de corte para una peptidasa de señal (-AXA), son insertadas en la membrana por la vía de secreción Sec, o posiblemente por la vía Tat. Las proteínas que son retenidas en el lado extracitoplásmico de la membrana, en la interface membrana-pared celular, son pseudopilinas exportadas por el sistema de secreción Com, o proteínas lípido-modificadas (+lipobox) exportadas por la vía Sec o Tat. De hecho, las partes maduras de ciertas proteínas contienen señales de unión a pared celular repetidas (+CWB), para ser retenidas. Estas proteínas de unión a pared pueden ser translocadas por la vía Sec o Tat. Finalmente, los transportadores tipo ABC, las vías Sec o Tat secretan proteínas al medio de cultivo.

1.5.2. Péptidos señal

Cuando emergen del ribosoma, los péptidos señal son reconocidos por chaperonas y/o factores de señalización, los cuales mantienen a la proteína desplegada y competente para ser translocada. Esto es esencial ya que el plegamiento prematuro evitaría el transporte de la proteína vía ruta Sec, lo cual podría ser perjudicial ya que esto daría como resultado el bloqueo de esta ruta (Lamiet & Pluckthun, 1989; Liu et al, 1989; Park et al, 1988). Tres dominios distintos, el N, H, y C, están presentes generalmente en los péptidos señal (von Heijne, 1984; von Heijne, 1990a; von Heijne, 1990b; von Heijne & Abrahmsen, 1989). El dominio N contiene al menos un residuo de arginina o lisina los que, al menos en *E. coli*, se ha sugerido interactúan con la maquinaria de translocación y/o los fosfolípidos negativamente cargados de la bicapa lipídica de la membrana (Akita et al, 1990; de Vrije et al, 1990). Como resultado, el dominio N del péptido señal sirve como el determinante topológico para el precursor en la membrana (von Heijne, 1986; von Heijne, 1992; von Heijne, 1994). La región H, enseguida de la región N, está conformada por una extensión de residuos hidrofóbicos que pueden adoptar una conformación de α -hélice en la membrana (Briggs et al, 1986). Residuos de glicina o prolina (bisagras) están presentes a menudo en la mitad de este núcleo hidrofóbico, lo cual permite la formación de una estructura tipo horquilla que puede insertarse en la membrana. Se ha propuesto que el desdoblamiento de esta horquilla resulta en la inserción del péptido señal completo en la membrana (de Vrije et al, 1990). El análisis del papel del dominio H muestran que el núcleo hidrofóbico es la estructura dominante que determina la función del péptido señal (Gennity & Inouye, 1991; Hikita & Mizushima, 1992a; Hikita & Mizushima, 1992b). Los residuos del rompimiento de la hélice en el extremo del dominio H están involucrados en la generación de una cadena β , la cual facilita el corte por las peptidasas de péptido señal (SPasas) (Paetzel et al, 1998). El dominio C, que sigue del dominio H, contiene el sitio de corte para estas SPasas, las cuales remueven el péptido señal de la parte madura de la proteína exportada durante o inmediatamente después de la translocación. Finalmente, el

péptido señal es degradado por las SPPasas y removido de la membrana. A pesar de la similitud entre las secuencias de los péptidos señal, aparentemente, pequeñas variaciones entre los mismos pueden afectar su transporte hacia diferentes destinos y/o exporte vía diferentes rutas. Por otra parte, un mismo péptido señal puede comportarse de forma distinta en diferentes hospederos, como fue demostrado por Collier en 1994 (Collier, 1994). A este respecto, es interesante notar que los péptidos señal de las bacterias Gram positivas son usualmente más largos que los de bacterias Gram negativas.

1.5.3 Clasificación de los péptidos señal

Mediante predicciones bioinformáticas, en *B. subtilis* se pueden distinguir por lo menos 300 proteínas con el potencial para ser exportadas (Tjalsma et al, 2000). En base al sitio de corte para la SPasa y la ruta de secreción por la cual este precursor será exportado (por predicción), los péptidos señal pueden ser divididos en cinco clases diferentes: I) péptidos señal secretorios (tipo-Sec), II) péptidos señal lipo-proteicos, III) péptidos señal doble-arginina (tipo-RR), IV) péptidos señal tipo pseudopilina, y V) péptidos señal de bacteriocinas y feromonas. Estas clases distintas de péptidos señal se muestran en la Figura 2 y se describen con más detalle a continuación.

1.5.3.1. Péptidos señal secretorios (tipo-Sec). La clase más abundante está compuesta de péptidos señal “típicos”. Estos péptidos señal dirigen las proteínas hacia la ruta Sec. Como consecuencia, estos son cortados por las peptidasas señal denominadas también tipo I (SPasa I) y, como resultado, las proteínas correspondientes son liberadas al medio de cultivo. Los 135 péptidos señal predichos de este tipo tienen en promedio una longitud de 28 residuos y contienen 2-3 residuos cargados positivamente, lisinas o argininas en su N-terminal. El dominio hidrofóbico (H) tiene en promedio una longitud de 19 residuos y aproximadamente 60% de estos péptidos señal tipo-Sec predichos contienen un residuo que rompe la hélice en la mitad de este dominio. El dominio C porta el sitio

de reconocimiento para el corte de la SPasa tipo I, con la secuencia consenso A-S-A en las posiciones -3 a -1 en relación al sitio de corte. Notablemente, las diferencias entre los péptidos señal tipo-Sec pueden ser fundamentales para el reconocimiento por factores de señalización.

1.5.3.2. Péptidos Señal de Lipoproteínas. La segunda clase de péptidos señal está presente en el extremo N-terminal de pre-lipoproteínas que son exportadas vía la ruta Sec, modificadas, y cortadas por la Peptidasa Señal tipo II (denominada SPasa II). Predicciones de posibles péptidos señales de lipoproteínas resultan en la identificación de 114 substratos potenciales para la SPasa Tipo II específica de lipoproteínas (Tjalsma et al, 1999a). Los péptidos señal de lipoproteínas tienen una longitud promedio de 19 residuos. Tanto el dominio N (en promedio 4 residuos) y el dominio H (en promedio 12 residuos) son más cortos que los correspondientes dominios en los péptidos señal tipo Sec que son cortados por las peptidasas señal tipo I. Además, los residuos bisagra no están conservados en la región H de los péptidos señal de lipoproteínas. El dominio C contiene la denominada “lipobox” con la secuencia consenso L-[A/S]-[A/G]-C. El invariable residuo de cisteína es el blanco de modificación lipídica y el primer residuo de la lipoproteína madura después del corte hecho por la SPasa II (Tjalsma et al, 2000). De hecho, la modificación lipídica de esta cisteína es indispensable para el corte por la SPasa II y el anclaje de la lipoproteína a la membrana.

1.5.3.3. Péptidos Señal Doble-Arginina (tipo-RR). Mediante el análisis bioinformático se han identificado 180 substratos potenciales para SPasas tipo I. Un motivo doble-arginina, que contiene por lo menos dos argininas consecutivas en combinación con un residuo hidrofóbico (#) de la secuencia consenso R-R-X-#-# se detectó en 15 de estos péptidos señal (Jongbloed et al, 2002). Otras trece proteínas conteniendo un dominio transmembranal o un péptido señal con un sitio de corte SPasa Tipo II también contienen el motivo RR-X-#-#. La presencia de estas señales fue interpretado como indicativo de que las pre-proteínas correspondientes podrían ser dirigidas hacia la ruta Tat para su exporte. Los

péptidos señal doble-arginina con un motivo consenso R-R-X-#-# contienen un sitio de corte predicho SPasa Tipo I, tienen una longitud promedio de 36 residuos aminoacídicos que es significativamente más largo que la longitud de péptidos señales tipo-Sec. Esto se debe principalmente al hecho de que los extremos N-terminal de estos péptidos señal son dos veces más largos que los dominios N de los péptidos señal tipo-Sec y tienen en promedio una longitud de 14 residuos. Además, contienen en promedio más residuos cargados positivamente que aquellos de los péptidos señal tipo-Sec (Tjalsma et al, 2000). Hasta el momento, de los 28 precursores con el consenso RR, únicamente se ha demostrado que PhoD y YwbN contienen péptidos señal donde el transporte es estrictamente Tat dependiente (Jongbloed et al, 2002; Jongbloed et al, 2004). De hecho, la longitud de los péptidos señal de PhoD (51 residuos) y YwbN (44 residuos) es mucho más larga que el promedio de los péptidos señal tipo-Sec (Figura 2).

La proteína LipA de *B. Subtilis* tiene un péptido señal de 31 residuos y el motivo consenso -RR-X-#-#, sin embargo es transportada exclusivamente por la vía Sec (Jongbloed et al, 2002). Esto sugiere que muchos de los péptidos señal doble-arginina también pueden ser reconocidos por componentes de otra maquinaria de transporte, por ejemplo por SecA. Con base en esos resultados, se puede decir que la longitud del péptido señal especialmente el dominio N es también crítico para el transporte Tat-dependiente. Otra posibilidad es que la naturaleza de la proteína madura pudiera jugar un papel importante en la translocación Tat-dependiente ya que una fusión del péptido señal de PhoD a la parte madura de la proteína Sec-dependiente β -lactamasa es transportada mediante un mecanismo independiente de Tat (Jongbloed et al, 2002).

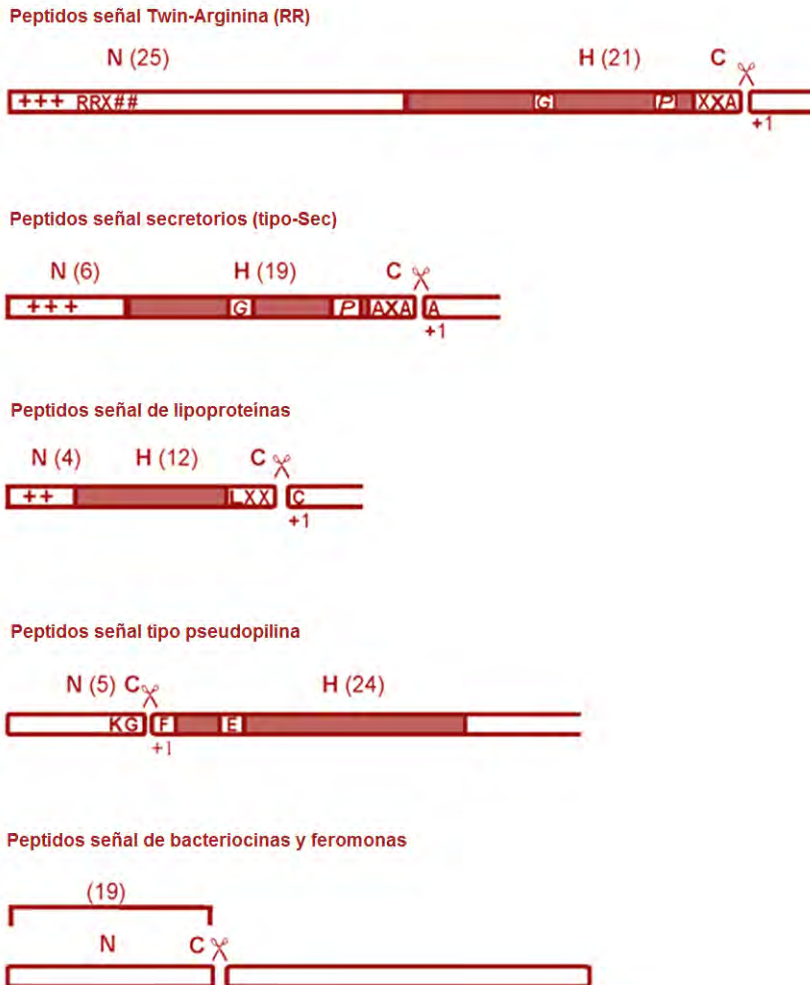


Figura 2. Clasificación de los péptidos señal N-terminal.

En base a la presencia o ausencia de un sitio de corte para una señal peptidasa y la ruta de secreción por la que los precursores son exportados, los péptidos señal predichos por análisis informático (Tjalsma et al., 2000) fueron divididos en cinco clases distintas: péptidos señal tipo doble-arginina (RR), péptidos señal secretorios (Tipo-Sec), péptidos señal de lipoproteínas, péptidos señal tipo-pseudopilinas, y péptidos señal de bacteriocinas y feromonas. La mayoría de los péptidos señal poseen una estructura más o menos similar: un dominio-N (N) cargado positivamente, conteniendo los residuos Lisina y/o Arginina (indicados con '+'), un dominio hidrofóbico dominio-H (H, indicado por una caja gris), y un dominio-C (C) que contiene el sitio de corte para su peptidasa señal específica (✂). La longitud promedio de los péptidos señal y sus sub-dominios es indicado (números entre paréntesis). Además, se indican los residuos de bisagra, por lo general glicina o prolina (G/P), que están presentes en el dominio-H de los péptidos señal tipo-Sec. Estos residuos se cree facilitan la inserción de los péptidos señal a la membrana celular y el corte por la señal peptidasa tipo I, respectivamente (Tjalsma et al., 2000). Finalmente, se indica el primer aminoácido que ocurre con mayor frecuencia en la primera posición de la proteína madura ('+1'). Nótese que la longitud promedio de los péptidos señal doble-arginina está determinada en base a los péptidos señal de las proteínas YwbN y PhoD, las únicas proteínas de *B. subtilis* que se sabe son secretadas estrictamente por la vía Tat.

1.5.3.4. Péptidos Señal tipo-Pseudopilina. La cuarta clase está conformada por péptidos señal de pseudopilinas que en *B. subtilis* son cortadas por la SPasa ComC (Lory & Strom, 1997). Solo cuatro proteínas con péptidos señal tipo pseudopilina se han identificado en *B. subtilis*; ComGC, GD, GE y GG (Tjalsma et al, 2000). Estos péptidos señal tipo pseudopilina tienen una longitud promedio de 33 residuos. El dominio-C de estos péptidos señal con la secuencia consenso K-G-F en las posiciones -2 a +1 relativas al sitio de corte para la SPasa, está localizado entre los dominios N y H. Esto concuerda con la observación de que la peptidasa señal tipo pseudopilina (ComC) actúa del lado citoplasmático de la membrana (Lory & Strom, 1997). Además del procesamiento, ComC también es responsable de la amino-metilación del residuo de fenilalanina en la posición +1 relativa al sitio de corte. Aunque los péptidos señal tipo pseudopilina muestran similitud estructural a los péptidos señal previamente descritos, los precursores de pseudopilinas se cree que omiten las rutas Tat y Sec y son transportadas probablemente *vía* la ruta específica Com (Chung et al, 1998; Chung & Dubnau, 1995; Tjalsma et al, 2000).

1.5.3.5. Péptidos Señal de Feromonas y Bacteriocinas. La quinta clase de péptidos señal se encuentra en feromonas sintetizadas en los ribosomas y bacteriocinas que son exportadas y cortadas por transportadores tipo ABC (por que poseen un casete de unión a ATP) (Nakano & Zuber, 1990). Esta clase específica de péptidos son denominados a menudo como “péptidos líder”. Estos péptidos líder consisten solo de dominios N y C, y carecen completamente de un dominio-H hidrofóbico. Se ha descrito que partes de la proteína madura son requeridas también para el exporte por un transportador ABC. Además, se sabe que los péptidos líder tienen funciones importantes en la prevención de actividad antimicrobiana prematura y son requeridas para la modificación post-traduccional de feromonas y bacteriocinas (van der Meer et al, 1994; van Kraaij et al, 1999).

1.5.4. Señales de Retención

La interface membrana-pared celular de *B. subtilis* define una área celular que es análoga al periplasma de las bacterias Gram-negativas y contiene muchas proteínas que cumplen importantes funciones (Merchante et al, 1995; Pooley et al, 1996). Las proteínas retenidas en la interface membrana-pared celular incluyen proteínas de unión a sustrato, chaperonas y factores de plegamiento involucrados en el proceso de secreción, RNasas, DNasas, enzimas involucradas en la síntesis de peptidoglicano, e hidrolasas de pared celular, las cuales están involucradas en la síntesis de la pared celular durante el desarrollo, división celular, esporulación y germinación (Babe & Schmidt, 1998; Blackman et al, 1998; Foster, 1993; Murray et al, 1997; Popham et al, 1996; Tjalsma et al, 2000). Para prevenir la pérdida de estas proteínas, debido a una posible liberación de la membrana celular tras el corte del péptido señal, varios mecanismos de retención y/o señales son empleados por las células, tales como dominios transmembranales (adicionales), modificación lipídica, ensamble de pseudopilinas, repeticiones de unión a pared celular, y/o unión covalente a la pared celular (Tjalsma et al, 2000).

1.6. Componentes Pre-translocacionales accesorios

En general, las proteínas que están destinadas a ser translocadas en un estado más o menos desplegado son reconocidas y unidas por factores citosólicos. Tales factores, denominados chaperonas, mantienen los precursores de proteínas secretorias en un estado translocación-competente previniendo su plegamiento y agregación. Algunas de estas chaperonas apoyan en el marcaje hacia la translocasa. Un gran subgrupo de proteínas exportadas de *E. coli* utilizan la chaperona SecB para su marcaje a la membrana, después de eso son transportadas de manera post-traducciona (Kumamoto & Francetic, 1993; Watanabe & Blobel, 1989). Un posible análogo de SecB, denominado CsaA, ha sido identificado en *B. subtilis*. Se demostró que CsaA es un supresor de una mutante termosensible SecA de *E.coli*. Además, CsaA fue capaz de complementar

parcialmente una cepa mutante de *E. coli* SecB (Muller et al, 1992). Puede ser que CsaA juegue un papel importante en el marcaje de proteínas precursoras hacia la translocasa-Sec en *B. subtilis*, ya que tiene afinidad por SecA y varios precursores como YvaY (Kawaguchi et al, 2001; Muller et al, 2000a; Muller et al, 2000b). Aunque CsaA es una proteína esencial, esta posible chaperona aparentemente posee menos importancia para la secreción de proteínas en *B. subtilis* que su análoga SecB en *E. coli*.

Hasta el momento, la partícula de reconocimiento de secuencia (SRP) es la chaperona mejor caracterizada en *B. subtilis*. La SRP es un complejo ribonucleoproteínico consistente en la proteína Ffh ensamblada sobre una estructura 7S RNA. La proteína similar a histona HbsU probablemente forma parte de este complejo. Sin embargo, chaperonas con una función más general en el plegamiento/ desplegado de proteínas también ayudan en el marcaje de proteínas y/o translocación. En *E. coli*, se ha demostrado que GroEL, GroES, DnaK, DnaJ, y GrpE están involucradas en la secreción de precursores SecB-independientes (Bochkareva et al, 1988; Kusukawa et al, 1989; Wild et al, 1992; Wild et al, 1996). Además, se demostró que GroEL interactúa con SecA y GroES pudiendo incluso modular un ciclo de asociación de SecA con la membrana y promoviendo su liberación (Bochkareva et al, 1988). Hasta la fecha, no se ha demostrado un papel de estas chaperonas generales en *B. subtilis*, pero GroEL-ES y DnaKDnaJ-Grp pueden facilitar la secreción previniendo que las proteínas adopten una conformación incompatible con la translocación en el citoplasma (Fekkes & Driessen, 1999). En *E. coli* se ha demostrado que la chaperona TF (Trigger Factor) interactúa con proteínas de secreción así como con proteínas citosólicas (Hesterkamp et al, 1996; Valent et al, 1997; Valent et al, 1995). En contraste a la situación en *B. subtilis*, TF es un componente esencial para el plegamiento del polipéptido naciente en *E. coli* (Reyes & Yoshikawa, 2002). No obstante, estudios de entrecruzamiento muestran que TF de *B. subtilis* interactúa con el péptido señal de la α -amilasa y compite con SRP. Esto sugiere que en *B. subtilis* TF también está involucrado en el marcaje de pre-proteínas hacia la membrana.

1.7. Ruta dependiente de la Partícula de Reconocimiento de la Señal (SRP).

En procariotes y eucariotes, el transporte de proteínas secretorias y proteínas membranales hacia la membrana plasmática o el retículo endoplasmático, respectivamente, es mediado por la partícula de reconocimiento de la señal (SRP) (Keenan et al, 2001; Luirink & Sinning, 2004). El modelo para la translocación de proteínas SRP-dependiente en *B. subtilis* está basado en los estudios de la translocación SRP-dependiente de *E. coli*. Cuando un péptido señal N-terminal emerge del ribosoma, la SRP de *E. coli* se une al péptido y forma un complejo denominado SRP/RNC (*ribosome nascent chain*). Este complejo interactúa con el receptor SRP que se encuentra unido a la membrana (FtsY) permitiendo la liberación de la RNC al canal de translocación. Esto conlleva a la disociación del complejo SRP/FtsY, como consecuencia estos componentes pueden intervenir en otra ronda de translocación. En *B. subtilis*, la proteína receptora de la SRP (FtsY) está probablemente involucrada en el marcaje de las preproteínas hacia el complejo SRP (Oguro et al, 1995). En *E. coli* se ha demostrado que FtsY interactúa con el translocón SecYEG (Angelini et al, 2005). La SRP es un complejo RNA-proteína presente en todos los organismos pero con diferente composición. El complejo SRP de *B. subtilis* consta de la proteína Ffh (Fifty-four homolog) (Honda et al, 1993), un RNA citoplasmático pequeño (scRNA), y una proteína similar a histona (HBsu) (Nakamura et al, 1992; Nakamura et al, 1994; Nakamura et al, 1999). La parte más conservada de la riboproteína SRP-RNA, el dominio IV (la hélice 8 en eucariotes), une a Ffh (Bernstein et al, 1989; Romisch et al, 1989). La HBsu es una proteína de unión a DNA (Klein & Marahiel, 2002) que es esencial para el crecimiento normal (Nakamura et al, 1999). HBsu se puede unir al dominio Ala del scRNA, como se ha demostrado por experimentos *in vitro* (Nakamura et al, 1999).

La función de Ffh y FtsY es esencial en *B. subtilis*, estas proteínas pertenecen a la ampliamente conservada familia de las SRP-GTPasas (Eichler & Moll, 2001). La interacción con los ribosomas, la presencia del canal de translocación, así como la

unión y liberación del péptido señal, induce una reacción y un cambio conformacional de estas SRP-GTPasas (Luirink & Sinning, 2004). Ffh consiste de tres dominios; el dominio N (dominio α -helice), el dominio G (dominio de unión nucleotídica), y el dominio M (dominio rico en metionina, responsable de la interacción del RNA y la unión del péptido señal) (Figura 3). FtsY consiste de los dominios N y G que son homólogos a los dominios N y G de Ffh. FtsY de *E. coli* contiene también un tercer dominio en su N terminal, un dominio ácido A, que es homólogo al dominio A de SR α en el receptor SRP de mamíferos. Sin embargo, notablemente FtsY de *B. subtilis* carece de este dominio A.

Aunque Ffh y FtsY son indispensables para la secreción de proteínas, crecimiento y viabilidad de *B. subtilis* (Hirose et al, 2000; Kobayashi et al, 2003), las células pueden ser privadas de estas proteínas por debajo de los niveles de detección sin causar bloqueos en la secreción. Sin embargo, bajo estas condiciones la secreción de un grupo específico de proteínas se ve reducida.

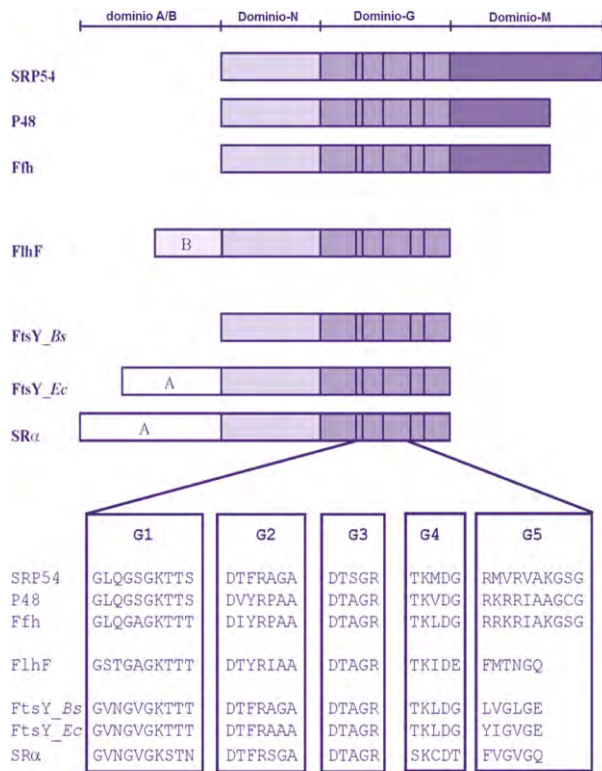


Figura 3. Dominios conservados en las proteínas de la familia SRP-GTPasa.

Representación esquemática de los miembros de la familia SRP-GTPasa de levadura (SRP54, SR α), *E. coli* (P48, FtsY_Ec), y *B. subtilis* (Ffh, FlhF, FtsY_Bs). Se pueden distinguir los dominios ácido "A"; el dominio básico "B", el dominio conservado N, el dominio M involucrado en la unión del RNA y la preproteína; y el dominio G o dominio de unión de GTP. Se muestran además, las cinco cajas G1 – 5 en el dominio G, definidos por (Eichler & Moll, 2001).

1.8. Translocasa Sec.

La maquinaria de secreción de pre-proteínas de la ruta Sec de *B. subtilis* consiste de al menos cuatro proteínas: SecA, que es el motor de translocación, y las proteínas integrales de membrana SecE, SecG y SecY (Figura 4A). En el modelo actual para la translocación de proteínas en *B. subtilis*, que tiene muchas similitudes con el de *E. coli*, ocurren varios pasos sucesivos (Economou, 2002; Fekkes & Driessen, 1999; Mori & Ito, 2001; Tjalsma et al, 2000; van Wely et al, 2001). Primero, SecA se une a la translocasa SecYEG en la membrana citoplasmática. Enseguida, las pre-proteínas son transferidas de un factor de marcaje (por ejemplo SRP; CsaA) a dímeros SecA que están unidos al complejo SecYEG. La unión de ATP por SecA lleva a la inserción del C-terminal de SecA dentro del poro que es formado por el complejo SecYEG en la membrana, resultando en la translocación de un fragmento corto de la pre-proteína. En el paso siguiente, se lleva a cabo la hidrólisis del ATP por SecA, provocando la liberación de la pre-proteína y liberación de SecA. La translocación posterior es dirigida tanto por el ciclaje repetido de SecA mediante la unión e hidrólisis de ATP y la fuerza motriz-protón. En adición al sub-complejo heterotrimérico SecYEG, la maquinaria Sec de *E. coli* contiene un segundo sub-complejo heterotrimérico compuesto de las proteínas SecD, SecF, y YajC. Aunque no ha sido demostrado experimentalmente, también existe un segundo sub-complejo que probablemente forma parte de la maquinaria Sec en *B. subtilis*. En *B. subtilis*, este complejo puede estar compuesto por SecDF “siamese twin” (una proteína de fusión natural entre SecD y SecF) (Bolhuis et al, 1998) y YrbF (el homólogo de YajC de *E. coli*).

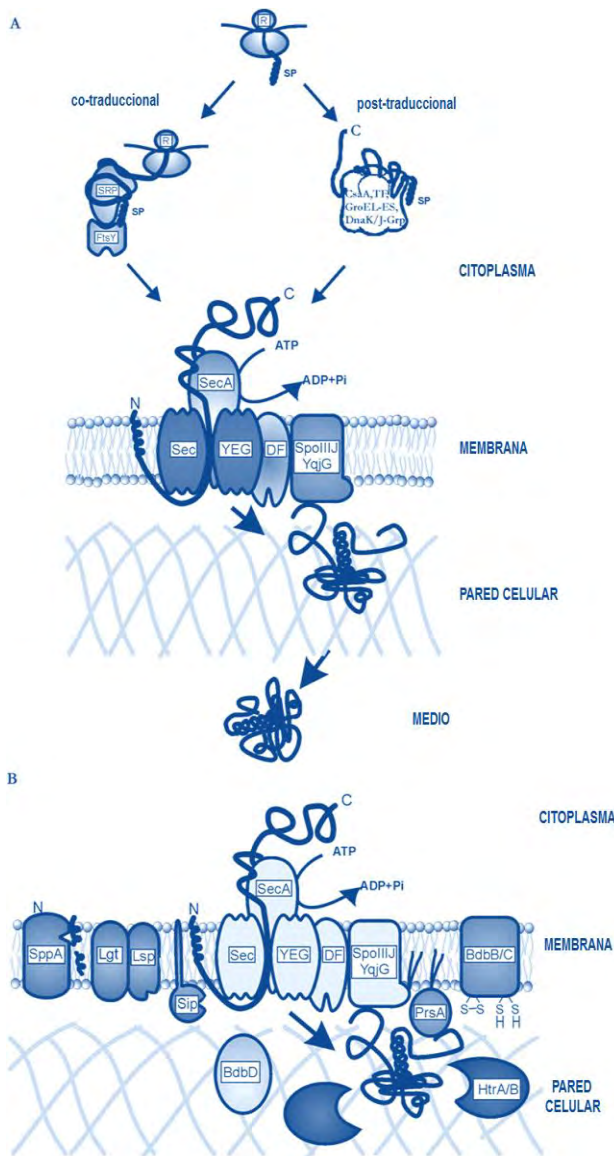


Figura 4. Componentes involucrados en el exportación de proteínas Sec-dependientes en *B. subtilis*.

(A) Las chaperonas citoplasmáticas, de las cuales SRP es la única chaperona específica de secreción, mantiene los precursores en un estado competente para la translocación y facilita su marcaje co-translocacional o post-traducciona hacia la translocasa-Sec en la membrana (SRP; CsaA; GroEL-ES; DnaK-DnaJ; TF). Nótese que el posible papel de GroEL-ES, DnaK-DnaJ o TF en la secreción de proteínas en *B. subtilis*, actualmente, no ha sido demostrado. La maquinaria de secreción Sec consiste de un motor ATP-dependiente SecA y el complejo heterotrimérico SecY, SecE, SecG, que forma un canal a través de la membrana. SecDF, SpoIIJ, y YqjC probablemente también están asociadas con la translocasa (Bolhuis *et al.*, 1998, Tjalsma *et al.*, 2000, 2004). **(B)** Durante o inmediatamente después de la translocación, el precursor es cortado por una de las peptidasas señal Tipo I (Sip; Tjalsma *et al.*, 1998), o lipido-modificadas por la diacil gliceril transferasa (Lgt; Leskelä *et al.*, 1999), y cortadas por la peptidasa señal específica de lipoproteínas (Lsp; Tjalsma *et al.*, 1999a). La peptidasa del péptido señal SppA puede estar involucrada en la degradación de los péptidos señal cortados (Bolhuis *et al.*, 1999a), mientras el plegamiento de varias proteínas que son secretadas depende de la actividad de las proteínas PrsA (Kontinen and Sarvas, 1993), BdbB/C/D (Bolhuis *et al.*, 1999b; Meima *et al.*, 2003) y/o SpoIIJ/YqjG (Tjalsma *et al.*, 2003). HtrA, HtrB (Noone *et al.*, 2001) y WprA (Margot and Karamata, 1996, Stephenson and Harwood, 1998) están involucradas en el control de calidad de las proteínas secretorias. BdbD, HtrA/B se representan en la figura en la pared celular, sin embargo, HtrA se detecta tanto en la membrana celular como en el medio de cultivo (Antelmann *et al.*, 2001). Tras el paso a través de la pared celular, la proteína madura es liberada al medio.

El papel exacto de SecDF-YajC en el exporte de proteínas no está claro, pero una variedad de posibles funciones han sido propuestas. Estas incluyen: 1) la remoción de los péptidos señal cortados o fragmentos transmembranales del canal de translocación SecYEG; 2) la liberación de las proteínas translocadas del canal de translocación; 3) la regulación del ciclaje de SecA; y 4) la prevención del retroceso de la pre-proteína (Nouwen & Driessen, 2002). A diferencia de SecD y SecF de *E. coli*, SecDF de *B. subtilis* 168 ha demostrado tener poco impacto en la viabilidad celular y el exporte de proteínas, por lo menos bajo condiciones estándar de laboratorio (Bolhuis *et al.*, 1998). Un defecto en la secreción de una

mutante *secDF* fue observado solo bajo condiciones de altos niveles de expresión de proteínas secretorias, tales como AmyQ de *B. amyloliquefaciens*.

Un componente final que puede ser asociado con la translocasa Sec de *E. coli* es la proteína YidC, la cual está involucrada en la inserción en la membrana de proteínas de membrana sintetizadas *de novo* (Luirink et al, 2001; Samuelson et al, 2000; Scotti et al, 2000). Interesantemente, se ha observado que YidC está ligada al sub-complejo SecYEG de la translocasa mediante el sub-complejo SecDF-YajC (Nouwen & Driessen, 2002). *B. subtilis* contiene dos homólogos de YidC, conocidos como SpoIIIJ y YqjG. Remarcablemente, la biogénesis de una variedad de proteínas integrales de membrana en *B. subtilis* es solamente medianamente afectada en células privadas tanto de SpoIIIJ y YqjG (Tjalsma et al, 2003). En contraste, la privación simultánea de SpoIIIJ y YqjG tiene un impacto severo, indefinido sobre, estados post-translocacionales en la secreción de proteínas como AmyQ, LipA, y PhoA de *E. coli* (Tjalsma et al, 2003).

1.9. Peptidasas señal Tipo I.

Una de las características más importantes de la maquinaria de secreción de *B. subtilis* es la presencia de múltiples SPasas tipo I parálogas. En muchas otras bacterias, arqueas y el Retículo Endoplásmico (ER) de levaduras, se ha visto que un solo tipo de SPasas tipo I es suficiente para el procesamiento de pre-proteínas secretorias (Tjalsma et al, 2000; Tjalsma et al, 1998; van Roosmalen et al, 2004). En el cromosoma de *B. subtilis* están localizados cinco genes *sip* para SPasas tipo I (denominados *sipS*, *sipT*, *sipU*, *sipV* y *sipW*) (Tjalsma et al, 1998; Tjalsma et al, 1997). Interesantemente, SipW es homólogo a SPasas encontradas en bacterias esporulantes Gram-positivas, arqueas y en la membrana del ER de eucariotes, los cuales en conjunto forman la sub-familia de SPasas tipo-ER. En contraste, todas las demás SPasas de *B. subtilis* son del tipo-procariótico (tipo-P). Tales SPasas tipo-P están presentes típicamente en eubacterias, mitocondrias y cloroplastos (Tjalsma et al, 1998). Aunque todas las SPasas codificadas cromosomalmente pueden procesar precursores secretorios, solo SipS y SipT son de gran

importancia para el procesamiento de las pre-proteínas y la viabilidad celular. En contraste, SipU, SipV y SipW tienen un papel menor en la secreción de proteínas y tienen especificidades por sustrato que difieren al menos parcialmente de las de SipS y SipT (Tjalsma et al, 1998; Tjalsma et al, 1997).

1.10. Catalizadores del plegamiento

Después de la translocación en un estado no plegado a través del canal Sec, las proteínas secretorias tienen que plegarse en su conformación nativa. Las proteínas no plegadas son altamente susceptibles a proteólisis por alguna de las varias proteasas asociadas con la pared celular de *B. subtilis*. Por lo tanto, el plegamiento rápido y correcto de la proteína translocada es crucial (Sarvas et al, 2004; Tjalsma et al, 2000; van Wely et al, 2001). A pesar de que las proteínas pueden plegarse espontáneamente *in vitro*, su plegamiento *in vivo* es asistido frecuentemente por catalizadores del plegamiento. Un importante catalizador del plegamiento involucrado en la secreción de proteínas es la lipoproteína PrsA, la cual muestra homología a peptidil-prolil *cis/trans* isomerasas (Rudd et al, 1995) y es esencial para la secreción de proteínas y viabilidad celular en *B. subtilis* (Kontinen et al, 1991; Kontinen & Sarvas, 1993). Las cepas que contienen formas mutantes de PrsA muestran un impedimento en la secreción de enzimas degradativas (Jacobs et al, 1993; Kontinen & Sarvas, 1993). Se ha sugerido que PrsA se requiere para la prevención de interacciones improductivas de proteínas secretorias no plegadas con la pared celular poco después de la translocación (Wahlstrom et al, 2003). La importancia de los catalizadores de plegamiento extracitoplasmático se pone de manifiesto por el hecho de que la interfase membrana-pared celular y el ambiente extracelular de *B. subtilis* son altamente proteolíticos (Tjalsma et al, 2000) (ver Factores de Control de Calidad). Esto resulta en la rápida degradación de las proteínas exportadas de origen homólogo y heterólogo que se pliegan con demasiada lentitud, o incorrectamente, después de la translocación (Bolhuis et al, 1999b; Bolhuis et al, 1999c). Inmediatamente después de la translocación de un subgrupo de proteínas secretorias conteniendo cisteínas,

debe ocurrir la formación de enlaces disulfuro. En *B. subtilis*, solo un limitado número de proteínas contienen enlaces disulfuro en su conformación nativa, como ComGC y ComGG. Los enlaces disulfuro de estas proteínas son importantes para su actividad y estabilidad. Las tiol-disulfuro oxidorreductasas se encuentran en las proximidades de la membrana, para llevar a cabo la formación de puentes disulfuro inmediatamente después de la translocación. Bolhuis y colaboradores describieron las tiol-disulfuro oxidoreductasas en *B. subtilis*, denominadas BdbA, BdbB, y BdbC con (limitada) similitud con tiol-disulfuro oxidoreductasas conocidas (Bolhuis et al, 1999a). Una cuarta tiol-disulfuro oxidoreductasa, BdbD, es altamente similar a DsbA de *Staphylococcus aureus* y fue descubierta y descrita por Meima et al. (2002). Debido a la limitada disponibilidad de sustratos nativos de tiol-disulfuro oxidoreductasas de *B. subtilis*, PhoA de *E. coli* es utilizada como una proteína modelo. Esta proteína contiene dos puentes disulfuro en su conformación nativa y puede ser producida por *Bacillus subtilis*. Las tiol-disulfuro oxidorreductasas BdbC y BdbD son importantes para el plegamiento correcto y la actividad de PhoA de *E. coli* (Bolhuis et al, 1999a; Meima et al, 2002). Además, la ausencia de BdbC BdbD ha demostrado tener un fuerte impacto en el desarrollo de la competencia, probablemente porque actúan como un par redox que cataliza la formación de enlaces disulfuro en las proteínas ComGC (Meima et al, 2002). BdbA no juega un papel importante en la formación de puentes disulfuro, ya que la interrupción del gen bdbA no afectó significativamente la secreción de PhoA de *E. coli* activa (Bolhuis et al, 1999a).

1.11. Proteasas Extracelulares

B. subtilis produce por lo menos 27 proteasas que residen en la membrana, la pared celular, o en el medio de cultivo. Estas proteasas pueden cortar (parcialmente) cadenas polipeptídicas no plegadas, que pone de manifiesto la importancia del plegamiento rápido y eficiente de las proteínas secretorias en su conformación nativa, resistente a la degradación proteolítica (Tjalsma et al, 2000). Las proteínas secretorias que no son correctamente plegadas por catalizadores de

plegamiento unidos a la pared celular, descritos en la sección anterior, son substratos potenciales de una de estas muchas proteasas. Esto puede deducirse de la observación de que proteasas extracelulares y asociadas a la pared celular son responsables de la degradación de varias proteínas heterólogas secretadas por *B. subtilis* (Bolhuis et al, 1999b; Wu et al, 1991). Sin embargo, debe tenerse en cuenta que incluso las proteínas heterólogas correctamente plegadas pueden ser sujetas a degradación.

Para investigar el impacto, de las proteasas secretadas, el proteoma extracelular de las cepas mutantes de *B. subtilis* WB700 (Ye et al, 1999) y WB800 (Wu et al, 2002), que carecen de siete y ocho proteasas extracelulares, respectivamente, fue investigado por electroforesis en geles de doble dimensión (Antelmann et al, 2003; Antelmann et al, 2002). Como se esperaba, las proteasas AprE, Bpr, NprE, Mpr, y Vpr estaban ausentes en el proteoma extracelular de estas cepas mutantes en comparación a la cepa parental. En la cepa WB800, la proteasa WprA está también ausente en el proteoma extracelular debido a la integración de un casete de higromicina en el gen correspondiente (Wu et al, 2002). Interesantemente, los niveles de la mayoría de las proteínas extracelulares no fueron afectados por las mutaciones o las interrupciones de estas proteasas, lo que concuerda con la idea de que las proteínas secretorias deben ser altamente resistentes a la actividad de las proteasas extracelulares de *B. subtilis*.

1.12. Factores de control de calidad y estrés de secreción

La producción de altos niveles de proteínas secretorias por las especies de *Bacillus* requiere de mecanismos de control de calidad activos durante el proceso de secreción. Las proteínas con un papel conocido en el control de calidad de proteínas secretorias son las dos proteasas/chaperonas similares a HtrA de *E. coli*, HtrA y HtrB (Noone et al, 2001). Se cree que estas proteínas poseen la capacidad de revisar el estado de plegamiento de las proteínas secretorias, como se ha demostrado para HtrA de *E. coli* (Spiess et al., 1999). Cuando una proteína

secretoria no está correctamente plegada, HtrA y/o HtrB pueden tanto asistir en su plegamiento o degradar las proteínas secretorias mal plegadas. Se ha observado que otra proteasa, WprA, está involucrada en el control de calidad de proteínas secretorias, Se ha propuesto que, además al dominio proteolítico (CWBP52), esta proteína también contiene un dominio de chaperona (CWBP23) (Antelmann et al, 2003; Antelmann et al, 2002; Babe & Schmidt, 1998; Margot & Karamata, 1996). Notablemente, HtrA y WprA tienen una localización dual, estando presentes en el proteoma de la pared celular y en el extracelular (Antelmann et al, 2003; Antelmann et al, 2002). En contraste a WprA, la cual es sintetizada con un péptido señal N-terminal, la proteína HtrA posee un ancla membranal N-terminal. Como se ha demostrado por secuenciación N-terminal, la variante de HtrA que se encuentra en el medio de cultivo carece de este dominio de anclaje de membrana (Antelmann et al, 2000). Hasta el momento, la localización de HtrB, la cual tiene un ancla membranal predicha como HtrA, no se ha documentado. Interesantemente, altos niveles de secreción de proteínas inducen la transcripción de los genes *htrA* y *htrB*, que es controlada por el sistema regulatorio de dos componentes CssR-CssS (Figura 5). Todos los estímulos que desencadenan una respuesta celular dependiente de CssRS son actualmente definidos como estrés de secreción (Antelmann et al, 2003). Este sistema regulatorio de dos componentes consiste de la proteína CssS, una histidin cinasa sensora, y la proteína CssR, un regulador de respuesta. Mas probablemente, CssS percibe el estrés de secreción y calor en la interface membrana-pared celular por estímulos que son directa o indirectamente causados por proteínas mal plegadas (Hyyrylainen et al, 2001). Como resultado, se cree que CssS se autofosforila, después de lo cual el grupo fosfato es transferido a CssR. Enseguida, la transcripción de genes específicos como *htrA* y *htrB* es regulada por CssR. Notablemente, la interrupción tanto de *htrA* o *htrB* causa un estrés de secreción dependiente de CssRS que induce fuertemente la actividad de los promotores de ambos genes, y esta respuesta es mediada por el sistema de dos componentes CssRS (Darmon et al, 2002; Hyyrylainen et al, 2001; Noone et al, 2001). Además, la transcripción tanto de *htrA* y *htrB* puede ser fuertemente reducida por la interrupción del gen *cssS*. Para monitorear el impacto

de HtrA y HtrB sobre la secreción de proteínas, se han analizado por electroforesis en gel 2D (Antelmann et al, 2003). La mancha o punto que corresponde a HtrA en el medio de cultivo se incrementó tras la interrupción del gen *htrB*.

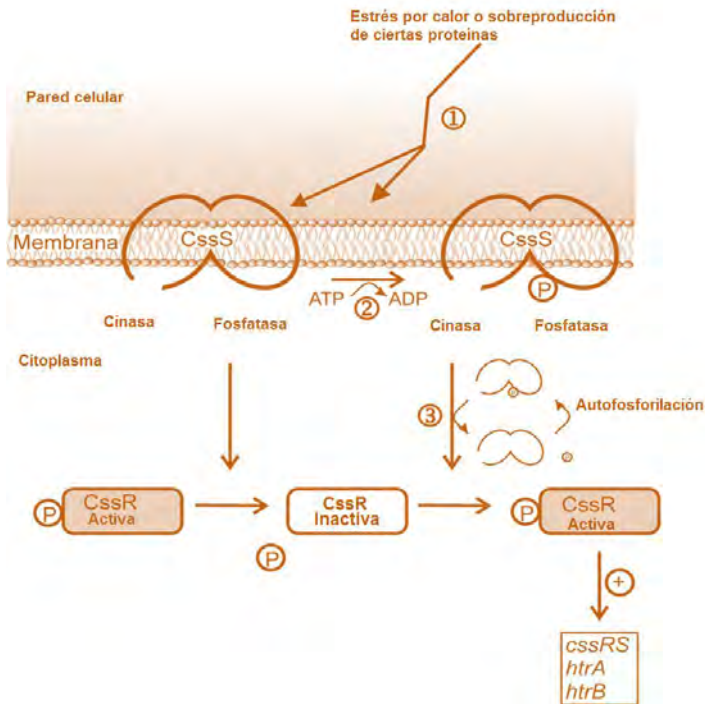


Figura 5. Representación esquemática de la respuesta a estrés Css-dependiente.

Los estímulos causados por calor o altos niveles de producción de ciertas proteínas secretorias son detectados por la proteína sensora CssS que se encuentra embebida en la membrana (1), desde donde muy probablemente esta proteína se autofosforila (2). Después, el grupo fosfato es transferido al regulador citoplasmático CssR (3), que, como resultado, se vuelve activo e induce la transcripción de *cssRS*, *htrA*, y *htrB*.

Bajo condiciones de estrés de secreción severos debido a la sobreproducción de, por ejemplo, AmyQ, este sistema regulatorio de dos componentes es esencial para la viabilidad celular (Darmon et al, 2002; Hyyrylainen et al, 2001). El nivel de expresión de la fusión *htrB-lacZ* correlaciona con los niveles de producción de AmyQ. Interesantemente, los altos niveles de producción de una variante no translocada de AmyQ no provoca una respuesta a estrés de secreción, mientras que los altos niveles de producción de interleucina 3 (IL3) humana y la lipasa A homóloga (LipA) desencadena una respuesta de estrés dependiente de CssRS. De acuerdo con esto, esta respuesta CssRS-dependiente puede ser considerada como una respuesta general a estrés de secreción en *B. subtilis*.

1.13. Replicación y conservación de los plásmidos en *B. subtilis*

Los vectores de clonación y expresión son herramientas muy importantes para el desarrollo de la ingeniería genética. Los vectores de clonación están basados frecuentemente en unidades replicativas autónomas, denominadas plásmidos, que se encuentran dentro de una célula de forma accesoria al cromosoma. La cepa de *B. subtilis* denominada 168, que ha servido como estándar para la mayoría de los estudios de ingeniería genética de la especie, no posee plásmidos endógenos, ni tampoco la mayoría de los aislados de *B. subtilis*, además, los plásmidos endógenos aislados de algunas cepas industriales de *B. subtilis*, no confieren fenotipos seleccionables en sus hospederos. Esta es la razón por la que la mayoría de los vectores utilizados hoy en día en esta bacteria están basados en plásmidos aislados originalmente de otras bacterias Gram positivas, como estafilococos y estreptococos (Boe et al, 1989; Novick et al, 1989; Weinrauch & Dubnau, 1983). Varios de estos plásmidos se replican autónomamente, y expresan sus genes de resistencia en *B. subtilis* (Haima et al, 1990; Lacks et al, 1986; Novick et al, 1989). Aunque se ha logrado la clonación exitosa y expresión exitosa de genes mediante la utilización de plásmidos exógenos, existe evidencia que pone de manifiesto que estos plásmidos no son óptimos para la producción de proteínas recombinantes en *B. subtilis*. Un problema frecuentemente observado es el alto nivel de inestabilidad plasmídica (Bron et al, 1991; Bron & Luxen, 1985; Meijer et al, 1995; Weinrauch & Dubnau, 1983). Pueden distinguirse dos tipos de inestabilidad plasmídica: estructural y segregacional. La inestabilidad estructural se refiere a re arreglos en el DNA que resultan en alteraciones estructurales del plásmido, la mayoría deleciones. La inestabilidad segregacional se refiere a la pérdida del plásmido completo de la población celular bajo condiciones no selectivas. Los mecanismos que causan dichas inestabilidades son solo entendidos en parte.

2. Objetivos

2.1. Objetivo General

Construir vectores integrativos y replicativos para la producción y secreción al medio de cultivo de hIL-2 e hIFN- γ utilizando como hospedero a la bacteria *B. subtilis*.

2.2. Objetivos específicos

Determinar la producción de hIL-2 e hIFN- γ en cultivos en lote de *B. subtilis*.

Evaluar el transporte de hIL-2 e hIFN- γ al medio de cultivo de *B. subtilis* por la ruta general de secreción SEC utilizando el péptido señal de la α -amilasa de *B. licheniformis*.

Evaluar la producción y secreción de hIL-2 e hIFN- γ en cultivos en lote de *B. subtilis* utilizando vectores integrativos y replicativos con distintos promotores.

3. Materiales y Métodos

3.1 Estrategia Experimental

Con la finalidad de lograr la expresión y secreción de hIFN- γ mediante la vía Sec de *B. subtilis* se construyeron 2 tipos de vectores (integrativos y replicativos) utilizando el péptido señal de la α -amilasa de *B. licheniformis*. La estrategia general se describe en la figura 6.

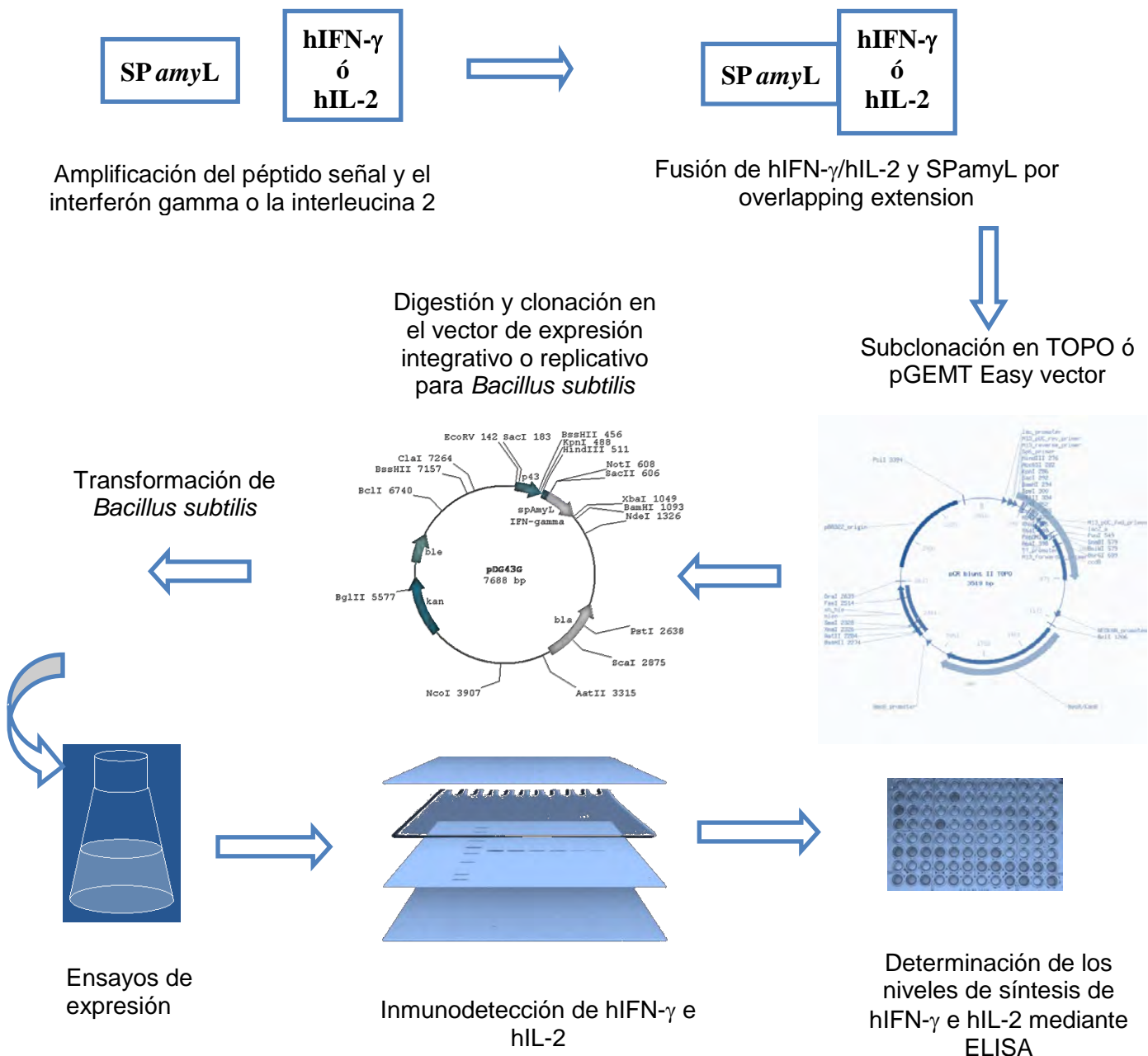


Figura 6. Diagrama de la estrategia experimental.

3.2. Cepas bacterianas y plásmidos

Las cepas de *Escherichia coli* DH5 α (Invitrogen) y *Bacillus subtilis* WB600 (proporcionada por el Dr. Wong de la Universidad de Calgary) fueron cultivadas de manera rutinaria en medio de cultivo Luria Bertani (Invitrogen); las características genotípicas de las cepas se muestran en la tabla 1. Los ensayos de producción y secreción de hIFN- γ fueron realizados en medio 2xL-Mal descrito por Morimoto et al. 2008. Cuando fue necesario a los medios de cultivo se les agregaron los siguientes antibióticos a las concentraciones finales que se indican a continuación: ampicilina (Amp) 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$; eritromicina (Er) 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$; kanamicina (Kan) 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

3.3. Extracción de ADN y procedimientos de transformación bacteriana

Los ensayos para la purificación de ADN, PCR, restricción, ligación, electroforesis en geles de agarosa y transformación de células competentes de *E. coli* se realizaron usando técnicas estandarizadas (ver anexo 2) (Sambrook et al. 1989). Las células competentes de *B. subtilis* fueron transformadas mediante la técnica descrita por Anagnostopoulos y Spizizen (ver anexo 2) (1961).

3.4. Construcción de los plásmidos de expresión

3.4.1. Construcción de un vector integrativo para la producción de hIL-2 en *Bacillus subtilis*.

El gen de la hIL-2 se amplificó mediante PCR utilizando como templado de la reacción el plásmido pCR2.1 TOPO/hIL-2 (Medina-Rivero; Tesis Doctoral) y los oligonucleótidos sentido 5'-GCCTCATTCTGCAGCAGCGATGGCCCCAACCTCCT C-3' y antisentido 5'-CTTTGTTAGCGGCCGCATCCCCTCGCG-3'. El oligonucleótido sentido contiene el sitio de reconocimiento para la enzima de restricción *NotI* (subrayado), mientras que el oligonucleótido antisentido contiene un adaptador complementario al extremo 3' del gen que codifica el péptido señal

de la α -amilasa de *B. licheniformis* (sp-amyL). El fragmento sp-amyL se amplificó mediante PCR utilizando como templado de la reacción el plásmido pAX01-B.L.amyL (proporcionado por el Dr. Colin Harwood de la Universidad de Newcastle, Reino Unido) utilizando los oligonucleótidos sentido 5'-GAAATGGGATCCAAAGGAGG-3' y antisentido 5'-GAGGAGGTTGGGGCCATCGCTGCTGCAGAATGAGGC-3'. El oligonucleótido sentido contiene un adaptador complementario al extremo 5' del gen de la hIL-2, mientras que el oligonucleótido reverso contiene el sitio de reconocimiento para la enzima de restricción *Bam*HI (subrayado). Los productos amplificados (hIL-2 y sp-amyL) fueron fusionados mediante la técnica de overlapping extensión (Ho et al. 1989), subclonados en el plásmido pGEMT-Easy vector (Promega) y digeridos con las enzimas *Bam*HI y *Not*I. El producto de restricción *Bam*HI-spamyL-hIL2-*Not*I fue clonado en el plásmido pAX01. El casete de resistencia original Er^r de pAX01 fue remplazado por el fragmento *Not*I-Kan^r-*Not*I del plásmido pBEST501 (Proporcionado por el Dr. Mario Pedraza Reyes de la Universidad de Guanajuato; Itaya et al. 1989), para generar el plásmido integrativo que denominamos pInt-il2.

3.4.2. Construcción de un vector replicativo para la producción de hIL-2 en *Bacillus subtilis*.

El casete spamyL-hIL2 se re-amplificó mediante PCR utilizando como templado de la reacción el plásmido pGEMT spamyL-hIL2 (este estudio) y los oligonucleótidos sentido 5'-AAGCTTAAAGGAGGTGATCCAG-3' y antisentido 5'-**CCCGGGGGATCCCCTCGAG**-3'. El oligonucleótido sentido contiene el sitio de reconocimiento para la enzima de restricción *Hind*III (subrayado), mientras que el oligonucleótido antisentido contiene tres mutaciones puntuales que insertan los sitios de restricción *Sma*I, *Bam*HI y *Xho*I (negritas, subrayado y cursivas, respectivamente). La fusión spamyL-hIL2 se subclonó en el plásmido pCR-BluntII Topo (Invitrogen) y fue extraída con las enzimas de restricción *Hind*III y *Bam*HI. El casete *Hind*III-spamyLhIL2-*Bam*HI se clonó finalmente en el plásmido replicativo para *B. subtilis* pDG148 (Proporcionado por el Dr. Mario Pedraza Reyes de la

Universidad de Guanajuato), esta estrategia elimina el gen regulador *lacI* del plásmido original, lo que promueve una expresión constitutiva del gen de interés, a este plásmido lo denominamos pSpac-il2.

3.4.3. Construcción de los vectores replicativos para la producción de hIFN- γ en *Bacillus subtilis*.

El gen optimizado *hIFN- γ* fue fusionado con la secuencia del gen que codifica para el péptido señal de la α -amilasa de *B. licheniformis* (sp-*amyL*) como se describe a continuación: el gen *hIFN- γ* fue amplificado mediante PCR utilizando como templado de la reacción ADN del plásmido pBAL (Balderas-Hernández et al. 2008) usando los oligonucleótidos sentido 5'- GCTGCCTCATTCCGCGGCCGCGCAGG ACCCATACGTG-3' y antisentido 5'-TCTAGATTACTGACTTGCACGACGACC-3'. La secuencia sp-*amyL* de *B. licheniformis* fue amplificada del plásmido pAX01-B.L.*amyL* usando los oligonucleótidos sentido 5'-AAGCTTAAAGGAGGTGATCCA G-3' y antisentido 5'- CACGTATGGGTCCTGCGCGGCCGCGGAATGAGGCAGC-3'. Los sitios de restricción *HindIII* y *BamHI* agregados a las secuencias de los oligonucleótidos se indican con una línea. Los dos fragmentos de PCR fueron fusionados mediante la técnica de overlapping extension (Ho et al. 1989), subclonados en el plásmido pCR2.1 (Invitrogen) y digeridos con las enzimas *HindIII* y *BamHI*. El producto de restricción *HindIII*-sp*amyL*-*hIFN γ* -*BamHI* fue clonado en el plásmido de expresión pDG148 (Stragier et al. 1988), el cual contiene el promotor PspaC, y el plásmido resultante fue denominado pSpac-gam.

Para la construcción del plásmido replicativo pRep-gam, la secuencia río arriba del marco de lectura abierto del gen *cdd* de *B. subtilis* 168 (conteniendo el promotor P43) fue amplificado utilizando los oligonucleótidos sentido 5'GATATCCCGCCTGCGCTGTTCTCA-3' y antisentido 5'-AAGCTTCCTCTCTTAC CTATAATGG-3' conteniendo los sitios de restricción *EcoRV* y *HindIII* respectivamente (subrayados). El fragmento *EcoRV*-P43-*HindIII* fue subclonado

en el plásmido pGEMT-Easy vector (Promega), digerido y clonado en el plásmido pSpac-gam previamente digerido con las enzimas *EcoRV* y *HindIII*.

3.4.4. Construcción del vector integrativo para la producción de hIFN- γ en *B. subtilis*.

El plásmido integrativo pInt-gam utilizado para la expresión constitutiva del gen *hIFN- γ* fue construido utilizando como base el plásmido pInt-il2 como se describe a continuación: El casete de expresión *SacI*-P43-*spamyLhIFN γ* -*BamHI* clonado en el plásmido pRep-gam fue digerido con las enzimas *SacI* y *BamHI* y clonado en los sitios correspondientes de pInt-il2. Este procedimiento eliminó el represor *xyIR* del plásmido original permitiendo la expresión constitutiva del gen *hIFN- γ* .

Todas las construcciones fueron verificadas por análisis de restricción y secuenciación (MCLAB, San Francisco, CA). Las principales características de los plásmidos utilizados en este estudio se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Cepas y plásmidos usados en este estudio.

Cepas y Plásmidos	Genotipo/propiedades relevantes ^a	Fuente/referencia
Cepas		
<i>E. coli</i> DH5 α	F ⁻ ϕ 80d/ <i>lacZ</i> Δ M15 <i>endA1 recA1 gyrA96 thi-1 hsdR17</i> (rK ⁻ mK ⁻) <i>supE44 relA1 deoR</i> Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169	Invitrogen Life Technologies (USA)
<i>B. subtilis</i>		
WB600	<i>trpC2 nprE aprE epr bpr mpr nprB</i> ; Em ^f	(Wu et al, 1991)
Plásmidos		
pBAL	Plásmido derivado de pET12a, contiene el gen <i>hIFN-γ</i> sintético clonado en los sitios de restricción <i>NdeI</i> - <i>BamHI</i> ; Ap ^r .	(Balderas Hernández et al, 2008)

pAX01	Vector integrativo para <i>B. subtilis</i> , con la capacidad de integrarse en una sola copia en el locus <i>lacA</i> ; Em ^r .	(Hartl et al, 2001)
pBEST501	pGEM4 conteniendo el gen Km ^r de pUB110	(Itaya et al, 1989) Proporcionado por el Dr. Mario Pedraza Reyes de la Universidad de Guanajuato
pAX01-B.L. <i>amyL</i>	Plásmido derivado de pAX01, conteniendo el gen de la α -amilasa de <i>Bacillus licheniformis</i> clonado en el sitio de restricción <i>Bam</i> HI; Em ^r	Proporcionado por el Dr. Colin Harwood de la Universidad de Newcastle, Reino Unido
pDG148	Vector flecha, replicativo en <i>E. coli</i> y <i>B. subtilis</i> , ColE1, <i>repB</i> , Ap ^r , Km ^r , contiene el promotor <i>PspaC</i> regulado por el represor <i>lacl</i> , inducible por IPTG; Km ^r	(Stragier et al, 1988) Proporcionado por el Dr. Mario Pedraza Reyes de la Universidad de Guanajuato
pSpac-gam	Plásmido derivado de pDG148, conteniendo el casete <i>spamyL-hlFNγ</i> marco abajo del promotor <i>PspaC</i> , el fragmento <i>Hind</i> III- <i>Bam</i> HI conteniendo el represor <i>lacl</i> fue eliminado; Km ^r	Este estudio
pRep-gam	Plásmido derivado de pSpac-gam, conteniendo el promotor P43 marco arriba del casete <i>spamyL-hlFNγ</i> ; Km ^r	Este estudio
pInt-gam	Plásmido derivado de pInt-il2, conteniendo el fragmento <i>Sac</i> I- <i>Bam</i> HI de pRep-gam correspondiente al casete P43 <i>spamyL-hlFNγ</i> ; Km ^r	Este estudio
pAXIL2	Plásmido que contiene los productos hIL-2 y <i>spamyL</i> fusionados por overlapping extension clonados en los sitios <i>Bam</i> HI y <i>Not</i> I de pAX01. El casete de resistencia original Er ^r de pAX01 fue remplazado por el fragmento <i>Not</i> I-Kan ^r - <i>Not</i> I del plásmido pBEST501.	Este estudio
pInt-il2	Plásmido que contiene entre los dos brazos del gen <i>lacA</i> , el marcador de resistencia a kanamicina de pBEST501 y el marco de lectura abierto del <i>hIL-2</i> fusionado con el péptido señal <i>spamyL</i> bajo el promotor PXYIA.	Este estudio
pSpac-il2	Plásmido que contiene el casete <i>spamyL-hIL2</i> reamplificado del constructo pInt-il2, clonado en los sitios <i>Hind</i> III- <i>Bam</i> HI del plásmido pDG148, que permite la expresión constitutiva de la hIL-2 bajo el promotor <i>PspaC</i> .	Este estudio

^a Km^r, marcador de resistencia a kanamicina; Em^r, marcador de resistencia a eritromicina; Ap^r, marcador de resistencia a ampicilina.

3.5. Expresión de hIL-2 y hIFN- γ

Las cepas de *B. subtilis* WB600 transformadas con los plásmidos integrativos y replicativos fueron propagadas en matraces Erlenmeyer de 250 mL conteniendo 50 mL de medio de cultivo 2xLMal suplementado con Kan ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$) e incubadas a 37°C por 42 h. Se colectaron alícuotas a diferentes tiempos y cosechadas mediante centrifugación a $1500 \times g$ durante 10 min para separar las células y el medio de cultivo. Las proteínas secretadas al medio de cultivo fueron precipitadas con 5 volúmenes de metanol; las pastillas de proteína fueron resuspendidas en 200 μL de PBS (140 mM NaCl, 7.2 mM Na_2HPO_4 , 2.8 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, pH 7.5) y alícuotas de 15 μL fueron analizadas por electroforesis en un gel SDS-PAGE de gradiente 4-20%. Para la obtención de las proteínas intracelulares, la pastilla de células fue lavada, resuspendida en amortiguador PBS y sonicada con un procesador ultrasonico GE 505 (Sonics, Newton, CT) usando 10 pulsos de 10 s con una amplitud de 25% y periodos de descanso de 10 s durante cada pulso. El homogenado celular fue centrifugado a $1500 \times g$ durante 10 min y el sobrenadante recuperado fue definido como la fracción intracelular; 15 μL de esta fracción fueron analizados por electroforesis en gel SDS-PAGE de gradiente 4-20%.

3.6. Detección de proteínas mediante análisis tipo Western blot y ELISA

Las distintas fracciones proteicas fueron separadas por electroforesis en gel SDS-PAGE de gradiente 4-20% y electrotransferidas a una membrana de nitrocelulosa (Amersham Biosciencias, Piscataway, NJ). Para el caso de la hIL-2 recombinante, esta fue detectada por inmunoblot; en estos ensayos, se utilizó como estándar a la proteína comercial rhIL-2 (PreproTech, Rocky Hill, NJ). El anticuerpo policlonal conejo anti hIL-2 (PreproTech, Rocky Hill, NJ) fue usado como anticuerpo primario a una concentración final de $0.15 \mu\text{g mL}^{-1}$. Por otra parte, el hIFN- γ recombinante fue detectado por inmunoblot, utilizando como estándar a la proteína comercial hIFN- γ (PreproTech, Rocky Hill, NJ). El anticuerpo policlonal conejo anti hIFN- γ (PreproTech) fue usado como anticuerpo primario a una concentración final de

0.15 $\mu\text{g mL}^{-1}$. El anticuerpo cabra anti IgG de conejo acoplado a fosfatasa alcalina (Invitrogen) fue utilizado como anticuerpo secundario en ambos casos a una dilución de 1:3000. Los inmunoblots, de ambas citocininas, fueron revelados con *p*-nitro azul de tetrazolio y 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato (NBT/BCIP, Amersham Biosciences; Piscataway, NJ). El análisis de los inmunoblots se llevó a cabo utilizando un documentador de fotos Gel-Doc 2000 (BioRad Laboratories, Segrate, Milan) y el programa Quantity OneTM v4.5 (BioRad).

La cuantificación de la hIL-2 y el hIFN- γ se realizó mediante los kits de ELISA anti-hIL-2 y anti-hIFN- γ (R&D Systems, Minneapolis, MN) siguiendo las instrucciones del proveedor.

4. Resultados y Discusión

4.1. Construcción de los vectores para la expresión de hIL-2

4.1.1. Construcción del vector integrativo plnt-il2

En la actualidad existen pocos reportes sobre la construcción de plásmidos integrativos para la expresión de proteínas humanas en *B. subtilis* (Jan et al, 2001; Wang et al, 2004). Por ello, en el presente trabajo se decidió construir un vector basado en el plásmido integrativo pAX01 para analizar la producción de la proteína hIL-2 en esta bacteria. Como primer paso, el gen de la hIL-2 se fusionó por la técnica denominada overlapping extension al péptido señal de secreción *sp-amyL* como se describe en materiales y métodos (Figura 7) esta fusión fue clonada en los sitios *Bam*HI-*Not*I del plásmido pAX01 generando el plásmido denominado pAXIL2 (Figura 8). La cepa de *Bacillus subtilis* carente de seis proteasas extracelulares utilizada en este estudio es resistente a lincomicina y eritromicina, por lo que el marcador de resistencia a eritromicina del plásmido pAXIL2 fue eliminado y sustituido por el marcador de resistencia a kanamicina proveniente del plásmido pBEST501 (ver detalles en materiales y métodos). La construcción final conteniendo el marcador de resistencia a Kan, el promotor *PXylA* y el marco de lectura abierto del *hIL-2* fusionado con el péptido señal *spamyL* entre los dos brazos del gen *lacA* de *B. subtilis*, fue verificada mediante análisis de restricción y fue denominada plnt-il2 (Figura 9). Debido a que el casete de resistencia a Kan proveniente de pBEST501 fue clonado en el sitio *Not*I del plásmido pAXIL2, se realizaron análisis de restricción para conocer la orientación del casete de resistencia con las enzimas *Not*I/*Bgl*II. Se analizaron un total de 4 cepas transformantes resistentes a kanamicina y ampicilina demostrándose que solo una de ellas poseía un plásmido con el casete en orientación positiva (el plásmido plnt-il2 es el que posee el casete Kan en orientación positiva). Para demostrar la presencia del casete de resistencia a Kan y el casete *spamyL*-hIL2, que conforman el plásmido plnt-il2 se realizaron los análisis de restricción con las enzimas *Bam*HI/*Not*I.

Tras la transformación de *B. subtilis*, se esperaba que la integración de esta construcción ocurriera por un evento de doble recombinación homóloga en el locus *lacA* (Figura 10), el resultado fue corroborado mediante PCR utilizando como templado de la reacción DNA genómico obtenido de la cepas transformantes de *B. subtilis* resistentes a Kan y los oligonucleótidos sentido y antisentido utilizados para amplificar el casete *spamyL-hIL2* de 587 pb.

Sin embargo, los análisis de ELISA de extractos celulares y medio de cultivo obtenidos de cepas transformantes inducidas con xilosa no detectaron la presencia de la proteína recombinante hIL-2.

El plásmido pAX01 fue desarrollado para estudiar la expresión de genes endógenos de *B. subtilis* tras la inducción con xilosa y no existen reportes en los que el promotor pXylA fuera utilizado para la producción de proteínas heterólogas. Por lo que las hipótesis para explicar la falla en la producción de la hIL-2 son: 1) el promotor pXylA no es un promotor eficiente para dirigir la expresión de genes humanos en *B. subtilis* y 2) Una copia única del gen de la hIL-2 integrado en el cromosoma de *B. subtilis* es insuficiente para conseguir una producción suficiente de la proteína como para ser detectada por ELISA. Estos resultados determinaron el cambio de la estrategia original que era el desarrollo de un plásmido integrativo para la producción de hIL-2 en *B. subtilis* y se decidió construir un plásmido de replicación autónoma.

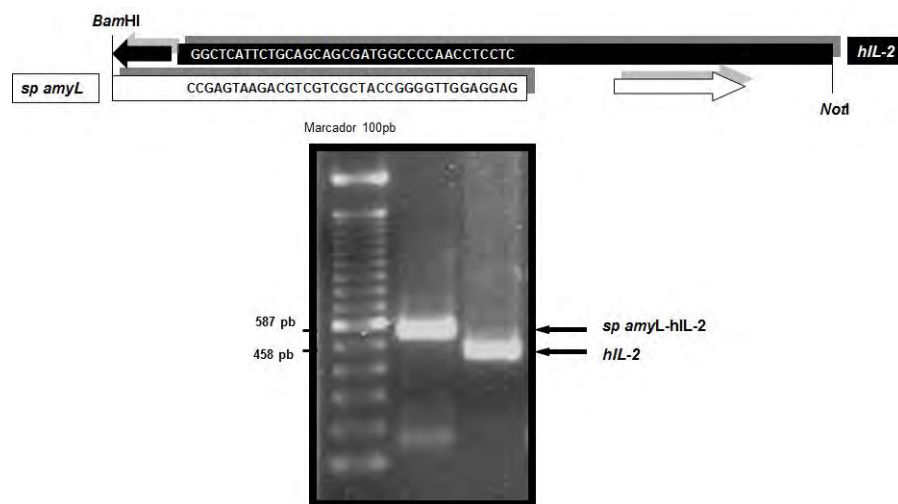


Fig. 7. Fusión por PCR del péptido señal de la alfa amilasa y la hIL-2 por overlapping extension.

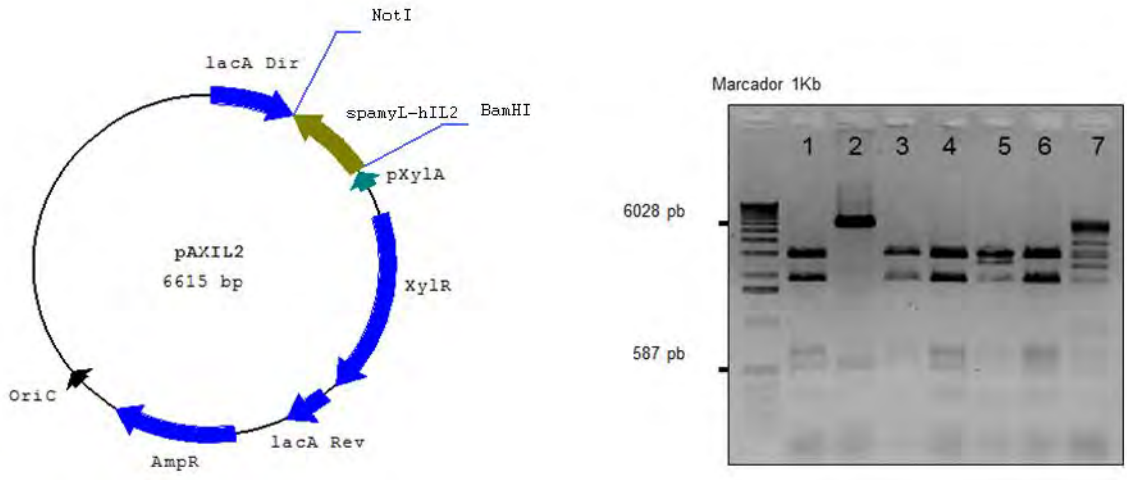


Fig. 8. Construcción del plásmido pAXIL2 (clonación de la fusión *spamyL-hiL2* en pAX01). Carriles 1, 3, 4, 5, 6; resultado negativo. Carril 2, pAX01 conteniendo la fusión *spamyL-hiL2* digerido con las enzimas *BamHI-NotI*.

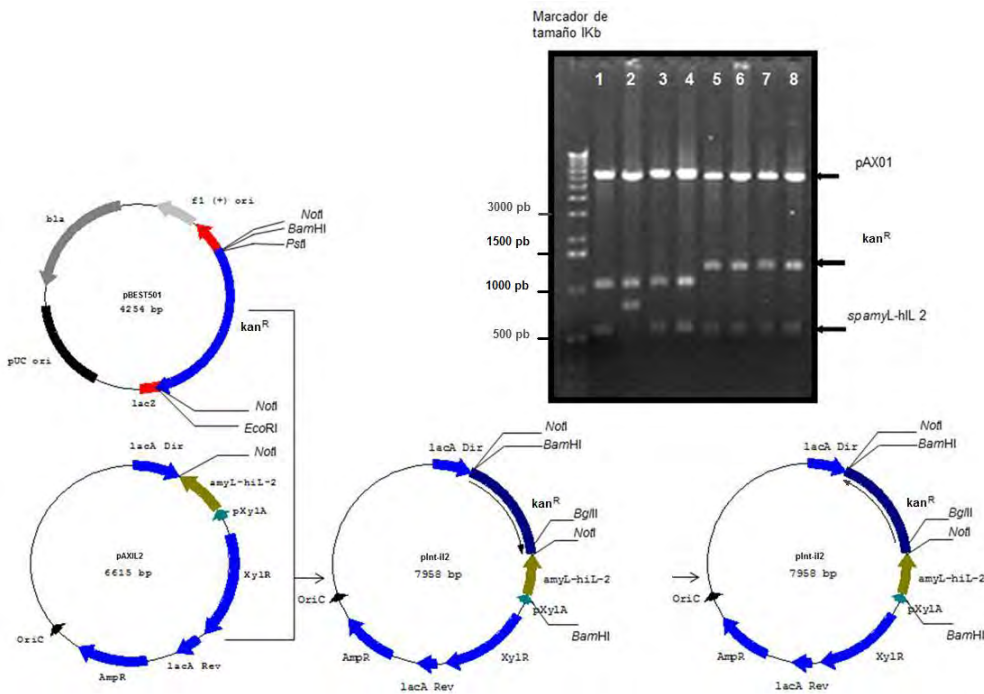


Fig. 9. Construcción del plásmido pInt-il2. Carriles 1, 2, 3 y 4; digestiones de los plásmidos con las enzimas *BamHI/BglII* para determinar la orientación del casete Kan. Carriles 5, 6, 7 y 8; digestiones de los plásmidos con las enzimas *BamHI/NotI*, donde se puede observar la liberación del marcador de resistencia Kan y de la fusión *spamyL-hiL2*.

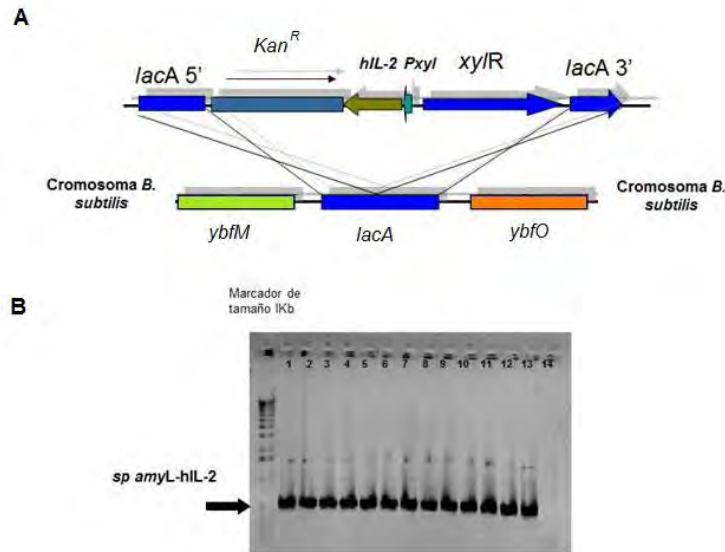


Fig. 10. A) Representación esquemática del evento de doble recombinación homóloga conducente a la integración de la construcción del plásmido pint-il2 en el locus *lacA* del genoma de *B. subtilis*. B) Análisis electroforético en un gel de agarosa al 1% que muestra la amplificación del casete *sp amyL-hiL2* DE 587 pb.

4.1.2. Construcción del vector autorreplicativo pSpac-il2

El gen hIL-2 fusionado al péptido señal de secreción *sp-amyL* reamplificado del constructo *plnt-il2* fue clonado en los sitios *HindIII-BamHI* del plásmido pDG148 (Figura 11). Esta estrategia elimina el gen represor *lacI* del vector original, generando un plásmido que se espera dirija la expresión constitutiva del gen hIL-2 desde el promotor *PspaC*. El plásmido pSpac-il2 fue analizado mediante restricción enzimática, confirmando el armado correcto del vector. Los ensayos de expresión en matraz de la cepa de *B. subtilis* WB600 transformada con el plásmido pSpac-il2 utilizando medio 2xLMal demostraron la capacidad de la cepa transformante de producir hIL-2. Sin embargo, como se muestra en la Figura 12 la mayoría de la proteína recombinante es detectada en los extractos celulares de forma inmadura, y solo una pequeña cantidad es secretada (aproximadamente 0.02 mg L^{-1} de 2 mg L^{-1} totales). Westers et al. (2003) reportaron la eficiente producción y secreción de la interleucina 3 humana (hIL-3) en *B. subtilis* WB700, una cepa que carece de siete proteasas extracelulares, utilizando un vector que

contenía el promotor p43 y el péptido señal optimizado de la α -amilasa de *B. licheniformis*, fusionados con el gen de la hIL-3. Dichos autores mostraron que utilizando esta construcción, no se detectaban niveles significativos de la citocinina en la fracción intracelular, lo que indicaba un procesamiento eficiente de la proteína recombinante y la subsecuente secreción de la proteína secretada (Westers et al, 2004). Con base en esos resultados, proponemos que la naturaleza de la proteína madura pudiera jugar un papel importante en la translocación eficiente de la proteína recombinante. En apoyo de esta observación Medina-Rivero et al. (2007) quién estudió la secreción de las citocininas hIFN- γ y hIL-2, fusionadas a un péptido señal Tat dependiente hacía el periplasma de *E. coli*, encontró que solamente el hINF- γ es transportado en forma soluble al periplasma, mientras que la hIL-2 solo sufrió un procesamiento parcial permaneciendo en el citoplasma. Considerando estos antecedentes decidimos estudiar la secreción del hIFN- γ en *B. subtilis*.

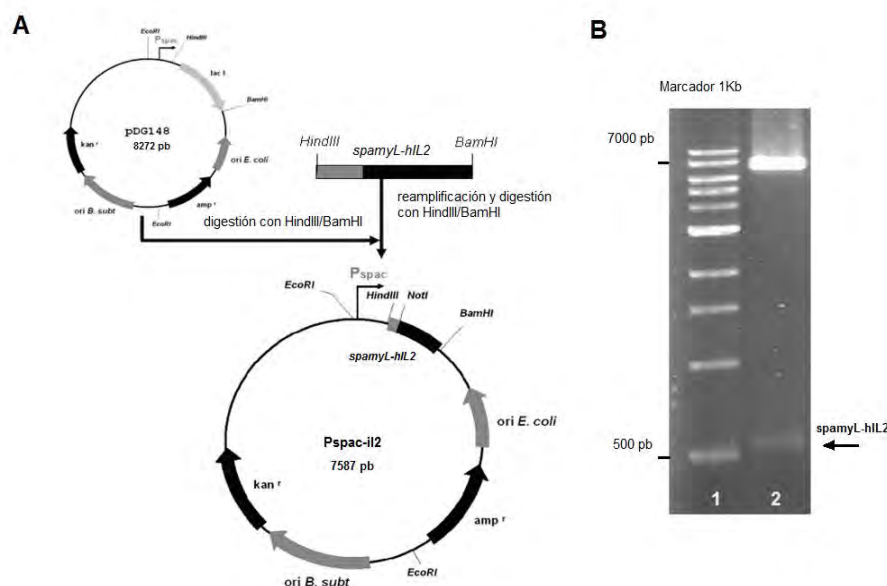


Fig. 11. A) Estrategia usada para la construcción de pSpac-il2. La fusión de 587 pb fue insertada en los sitios *HindIII-BamHI* del pDG148 lo cual elimina el gen represor de Pspac (*lacI*). B) Análisis de restricción de Pspac-il2 con *HindIII-BamHI*; carril 1: Marcador de tamaño, carril 2: liberación del casete *spamyL-hIL2*.

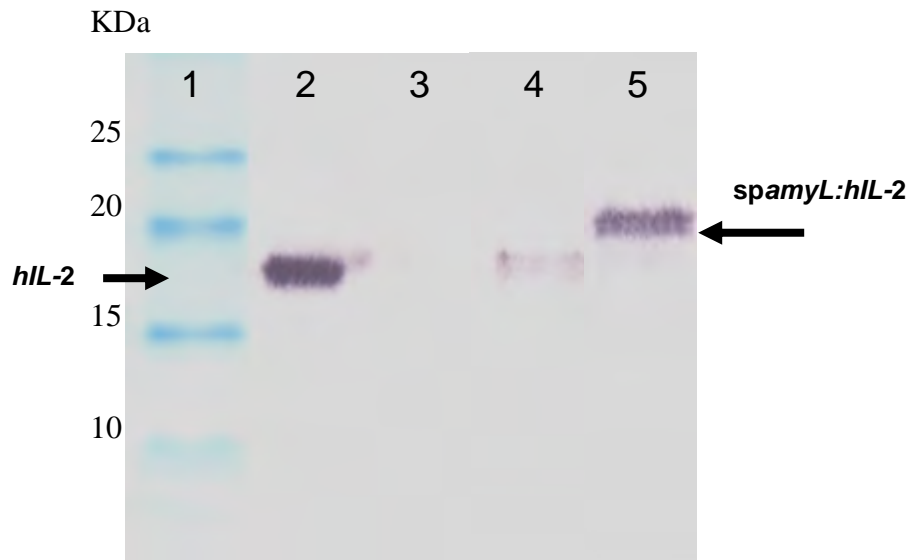


Fig. 12. Análisis tipo Western blot de la producción de hIL-2 por la cepa *B. subtilis* WB600 conteniendo el plásmido Pspac-il2. Muestras de cultivos en lote de 24 h fueron cosechadas y procesadas para la extracción de las proteínas intracelulares y secretadas como se indica en materiales y métodos; la presencia de la hIL-2 fue detectada con el anticuerpo secundario cabra anti-IgG de conejo (peprotech) Carril 1, Marcador de peso molecular; Carril 2, estándar de hIL-2 (peprotech); Carril 3, cepa control sin transformar; Carril 4, hIL-2 secretada al medio de cultivo, Carril 5, hIL-2 detectada en la fracción intracelular.

4.2. Construcción de los vectores para la expresión de hIFN- γ

Para lograr la producción del hIFN- γ en *B. subtilis*, se llevaron a cabo tres construcciones usando un gen sintético optimizado del *hIFN- γ* y los promotores Pspac y P43, utilizando tanto vectores integrativos como autorreplicativos.

La preferencia del uso de codones es uno de los factores que más que afectan la expresión de genes en sistemas heterólogos (Gustafsson et al, 2004). Para evitar problemas en la eficiencia de la traducción se decidió utilizar un gen *hIFN- γ* sintético ya que el gen *hIFN- γ* nativo posee 16 codones reportados como “raros” para *B. subtilis*. Para mejorar este aspecto se modificó la secuencia del gen nativo con base a la preferencia del uso de codones de *B. subtilis* (tabla 3). El gen sintético optimizado mostró un 75.69% de identidad con respecto al gen silvestre (Figura 13).

Tabla 3. Resumen de la preferencia de codones en *Bacillus subtilis* presentes en el hIFN- γ silvestre y el gen sintético optimizado.

Aminoacid	Wild-type hIFN- γ gene	Synthetic hIFN- γ gene	Codon usage in <i>B. subtilis</i> (%)
Arg	CGC, CGA, AGA, AGG	CGT	19
Leu	TTA, TTG, CTT, CTC, CTG	TTA, TTG, CTT, CTG	23, 15, 24, 23
Gly	GGT, GGC, GGA, GGG	GGT	21
Pro	CCA	CCA	21
Thr	ACT, ACC, ACA	ACT, ACC, ACA	18, 14, 45
Phe	TTT, TTC	TTT, TTC	67, 33
Ile	ATT, ATC, ATA	ATT, ATC	50, 34
Val	GTC, GTA, GTG,	GTT, GTC, GTA, GTG	30, 23, 23, 24
Ser	TCC, TCA, TCG, AGT, AGC	TCT, TCC, TCA	24, 13, 20
Ala	GCT, GCA, GCG	GCT, GCC, GCA	26, 18, 32
Tyr	TAT, TAC	TAT, TAC	67, 33
His	CAT	CAT, CAC	68, 32
Gln	CAA, CAG	CAA, CAG	55, 45
Asn	AAT, AAC	AAT, AAC	53, 47
Lys	AAA, AAG	AAA	73
Asp	GAT, GAC	GAT, GAC	64, 36
Glu	GAA, GAG	GAA, GAG	70, 30
Stop	TAA	TAA	66



Fig. 13. Alineamiento de la secuencia nucleotídica del gen hIFN- γ silvestre (*Wild type* hIFN gamma gene) y del gen sintético optimizado (Synthetic hIFN gamma gene) descrito en este trabajo.

4.2.1. Construcción del plásmido replicativo pSpac-gam

El gen sintético *hIFN- γ* fusionado por overlapping extensión (extensión sobrelapada) al péptido señal de secreción *sp-amyL* (Figura 14A) fue clonado en los sitios *HindIII*-*Bam*HI del plásmido pDG148 (Figura 15A). Esta estrategia elimina el gen represor *lacI* del vector original, generando un plásmido que dirige la expresión constitutiva del gen *hIFN- γ* bajo el promotor PspaC. Adicionalmente, los sitios de restricción *NotI*, *SacII* y *XmaIII* fueron agregados como un sitio de clonación múltiple río arriba de *sp-amyL*. El plásmido pSpac-gam fue corroborado mediante análisis de restricción (Figura 15B). Para ver los detalles de la construcción ver materiales y métodos.

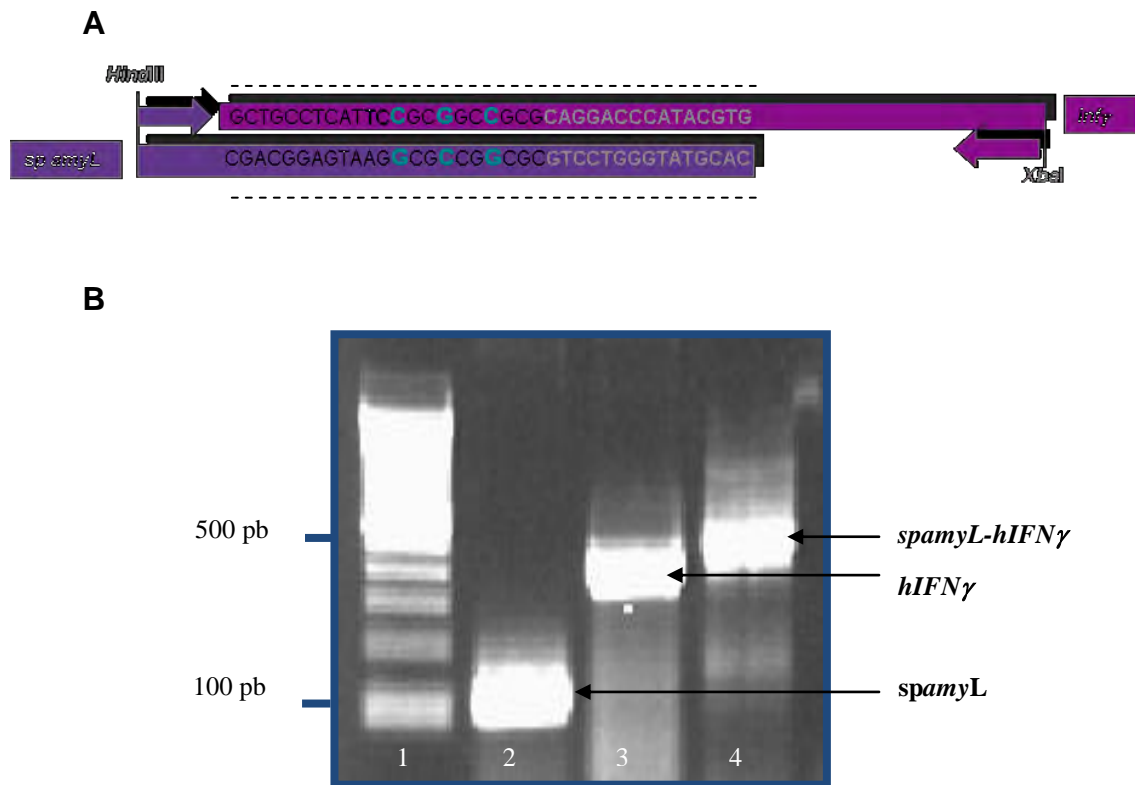


Figura. 14. A) Representación esquemática de la fusión por overlapping extension del péptido señal *sp-amyL* y el *hIFN- γ* , donde se señalan con líneas punteadas los sitios de sobrelapamiento de los genes fusionados y con letras mayúsculas en azul las mutaciones insertadas en los oligonucleótidos para la generación de los sitios de clonación *NotI*, *SacII* y *XmaIII*. B) Análisis electroforético en un gel de agarosa al 1% de la amplificación mediante PCR del péptido señal *sp-amyL* (carril 2), *hIFN- γ* (carril 3) y la fusión *spamyL-hIFN γ* (carril 4); marcador de tamaño 100 pb (carril 1).

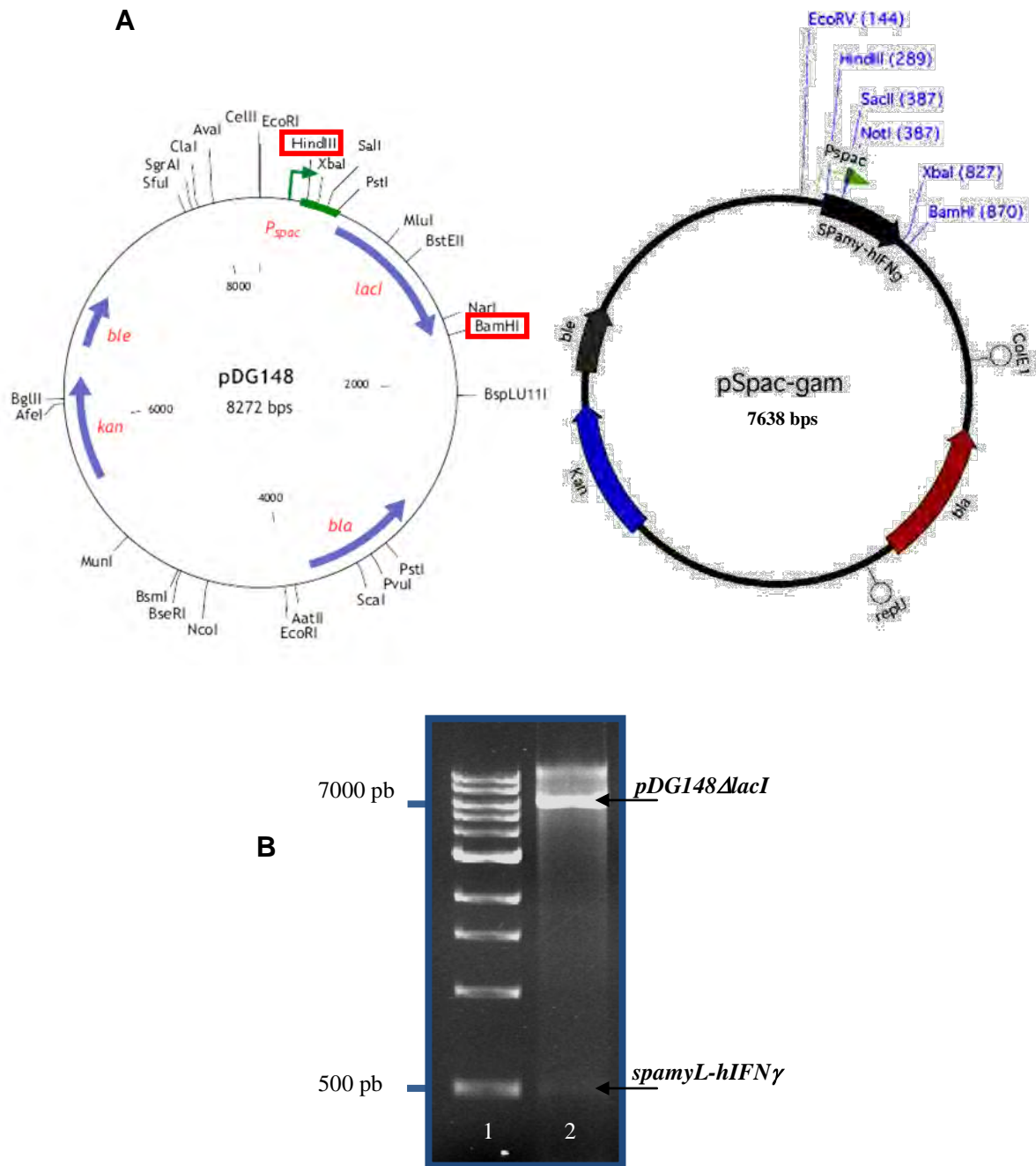


Figura. 15. A) Representación esquemática de la construcción del plásmido pSpac-gam donde se indican con recuadros rojos los sitios de inserción de la fusión *spamyL-hIFN γ* en el plásmido pDG148, lo que elimina el gen represor de Pspac (*lacI*). B) Análisis electroforético de la construcción pSpac-gam, Marcador de tamaño 1Kb (carril 1), digestión con las enzimas *HindIII-BamHI* de pSpac-gam conteniendo la fusión *spamyL-hIFN γ* (carril 2).

4.2.2. Construcción del plásmido autorreplicativo pRep-gam

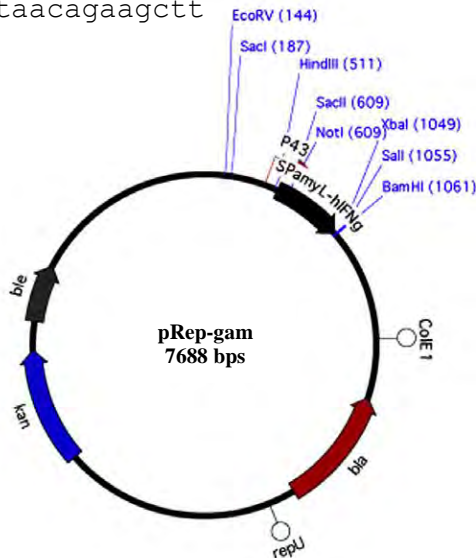
El promotor P₄₃ se ha utilizado eficientemente para la construcción de sistemas de producción de proteínas heterólogas en *B. subtilis*. Este promotor, en realidad está formado por dos promotores sobrelapados reconocidos por la ARN polimerasa de *B. subtilis* conteniendo los factores σ^A y σ^B (Figura 16 A). Para la construcción de pRep-gam el promotor P₄₃ fue amplificado y clonado en los sitios *EcoRV* y *HindIII* del plásmido pSpac-gam previamente digerido con las mismas enzimas (Figura 16 C).

A

```

aagcttcgtgcatgcaggccggggcatatgggaaacagcgcggacggagcgggaatttc
caatttcattgcccagcagcgcctgctgttctcaatttgcggcttccttgtagagctca
gattattgagtgatgattatattcctttgataggtggtatgttttcgcttgaact
tttaatacagccattgaacatacggttgatttaataactgacaaacatcacctctt
gctaaagcggccaaggacgctgccgcccggggctgtttgcgtttttgccgtgatttcgt
gtatcattggtttacttatttttttgccaaagctgtaatggctgaaaattcttacatt
tattttacattttttagaaatgggcgtgaaacaféaaaagcgcgcgattatgtaaaatazulataaa
gtgatagcggtacaféccattataggtgaagagaggcaféaatgtacacatgaacagacaagaatta
ataacagaagctt
  
```

B



C

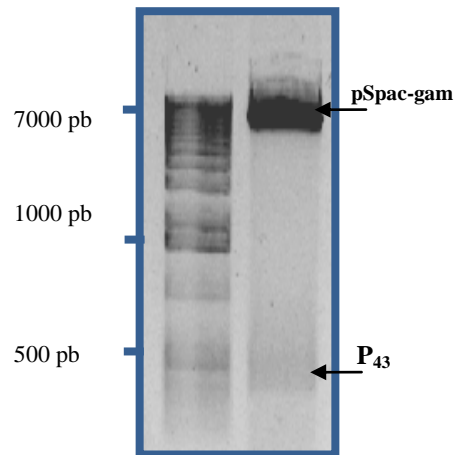


Figura 16. A) Región reguladora del gen *cdd* de *B. subtilis*. Las secuencias subrayadas indican las secuencias de los promotores reconocidos por los factores de transcripción σ^A y σ^B (café y azul respectivamente). Se indican los oligonucleótidos utilizados para amplificar mediante PCR un fragmento de 363 pb. B) Representación esquemática del plásmido pRep-gam. C) Análisis de restricción del plásmido pRep-gam con las enzimas *EcoRV* y *HindIII*.

4.2.3. Construcción del plásmido integrativo pInt-gam

El vector integrativo pInt-gam fue basado en el plásmido pInt-il2, para probar la producción del hIFN- γ , mediante la integración de una sola copia del gen del interferón gamma bajo el control del promotor fuerte constitutivo P43 ya que no se detectó producción de la hIL-2 utilizando el plásmido integrativo que dirige la transcripción de genes desde el promotor pXyl (pAX01). El plásmido integrativo denominado pInt-gam contiene un casete de resistencia a kanamicina, el promotor P43, el marco de lectura abierto del *hIFN- γ* fusionado con *sp-amyL*, y un sitio de clonación múltiple entre los dos brazos del gen *lacA* de *B. subtilis* (Figura 17 A). La construcción del plásmido fue verificada mediante análisis de restricción (Figura. 17 B). Tras la transformación de *B. subtilis*, se espera que la integración de esta construcción ocurra por un evento de doble recombinación homóloga en el locus *lacA* (Figura 17 C).

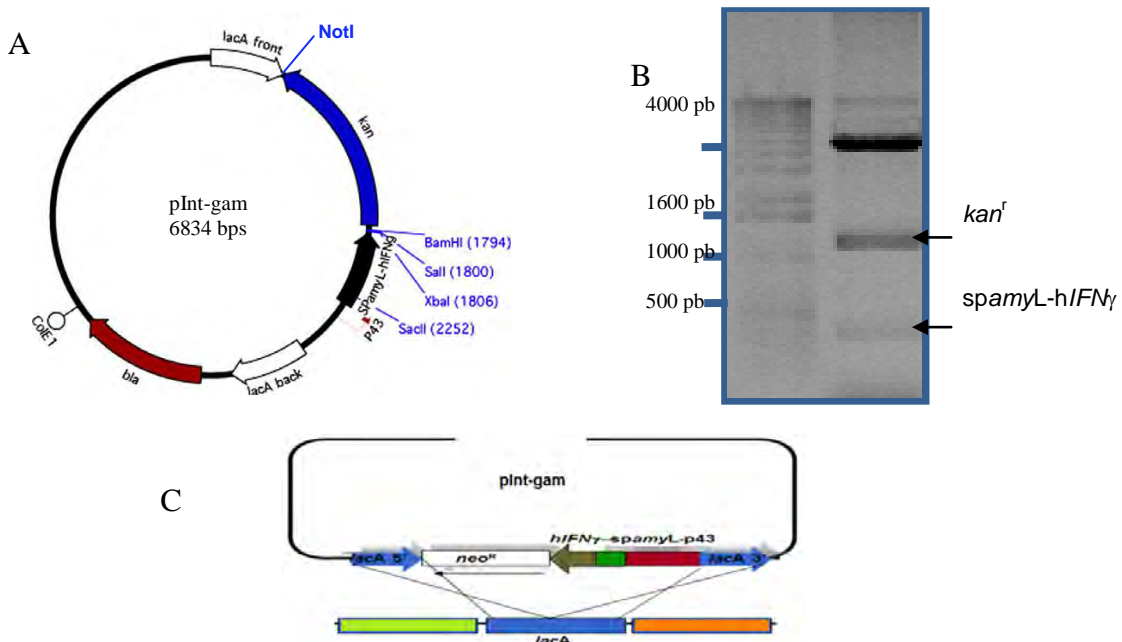


Figura 17. A) Representación esquemática de pInt-gam. B) Análisis de restricción del plásmido con las enzimas *BamHI-NotI*. C) Representación esquemática del evento de doble recombinación homóloga entre el casete flanqueado por los brazos 5' y 3' del gen *lacA* contenido en el plásmido pInt-gam y el cromosoma de *B. subtilis*.

4.3. Producción de hIFN- γ usando los plásmidos replicativos e integrativos en *B. subtilis*

Para estudiar la secreción de hIFN- γ al medio de cultivo se llevaron a cabo cultivos típicos en lote de las cepas *B. subtilis* anota los códigos y entre paréntesis los plásmidos que portan. Como se muestra en la figura 18 A, todas las cepas generadas en este estudio muestran una velocidad de crecimiento específica similar de 0.18 h^{-1} , lo que demuestra que el tipo de vector insertado en la cepa, no afecta su crecimiento. La cepa WB600/pInt-gam, mostró un incremento de biomasa hasta alcanzar un máximo de 2.1 gDCW L^{-1} a las 24 h de cultivo, después del cual permaneció constante, mientras que las cepas WB600/pSpac-gam y WB600/pRep-gam alcanzaron un máximo de 2.5 gDCW L^{-1} .

Las concentraciones del hIFN- γ total y secretado se muestran en la Figura 18 B y 18 C, respectivamente. Como puede observarse, la producción máxima de hIFN- γ de 20.2 mg L^{-1} fue alcanzada por la cepa WB600 conteniendo el plásmido pRep-gam a las 30 h aproximadamente, después de este tiempo, la concentración del hIFN- γ disminuye. El plásmido pRep-gam, fue construido intercambiando el promotor original PspaC del plásmido pDG148 por el promotor fuerte constitutivo p43. Este promotor ha sido utilizado con anterioridad para la producción de proteínas recombinantes en *B. subtilis* con buenos resultados, y la cantidad total de hIFN- γ producida en este trabajo fue comparable a los valores de otras proteínas terapéuticas producidas en *B. subtilis* (Tabla 2). Sin embargo, a diferencia de los trabajos antes mencionados, gran parte de la proteína se encontró en la fracción intracelular y solo 0.19 mg L^{-1} fueron secretados al medio de cultivo, indicando que la maquinaria de secreción de *B. subtilis* se saturó rápidamente (Figura 18 C). Medina-Rivero et al. (2007) reportan un procesamiento eficiente (no se observa la forma inmadura) del hIFN- γ utilizando los péptidos señal de la penicilino acilasa (SPpac) y los promotores sintéticos SP1 y SP3 que dirigen respectivamente las proteínas al periplasma de *E. coli* a través de las rutas Tat (el primero) y Sec (el segundo). Estos resultados sugieren que la naturaleza

del hIFN- γ no interfiere con la translocación eficiente al periplasma de *E. coli*. Tomando en cuenta que el funcionamiento de la mayoría de los sistemas de secreción estudiados en *B. subtilis* ha resultado similar a lo encontrado para *E. coli*, nosotros esperábamos que el procesamiento y secreción del hIFN- γ al medio de cultivo de *B. subtilis* fuera igualmente eficiente que para el caso de *E. coli*. Esta diferencia de resultados, puede deberse a un reconocimiento ineficiente del sitio de corte SAAA del péptido señal sp-amyL por las peptidasas señal principales de *B. subtilis* (SipS y/o SipT), o que el péptido nativo SAAA es reconocido por peptidasas señal secundarias como SipU, SipV o SipW que son producidas en cantidades inferiores a las de SipS y SipT (Tjalsma et al., 1997). Apoyando la primera teoría, Westers et al. en 2004, modificaron el péptido señal original de la α -amilasa de *B. licheniformis* a la secuencia consenso SASA, para lograr una secreción eficiente de la hIL-3 al medio de cultivo de *B. subtilis* (Westers et al, 2004).

Por otra parte, las cepas conteniendo los plásmidos pSpac-gam y plnt-gam producen respectivamente un máximo de 2 y 2.5 mg L⁻¹ de hIFN- γ a las 24 h del cultivo, después de este tiempo la cantidad del producto disminuye. La concentración máxima de hIFN- γ secretado fue 0.065 y 0.09 mg L⁻¹, respectivamente (Figura 18 C).

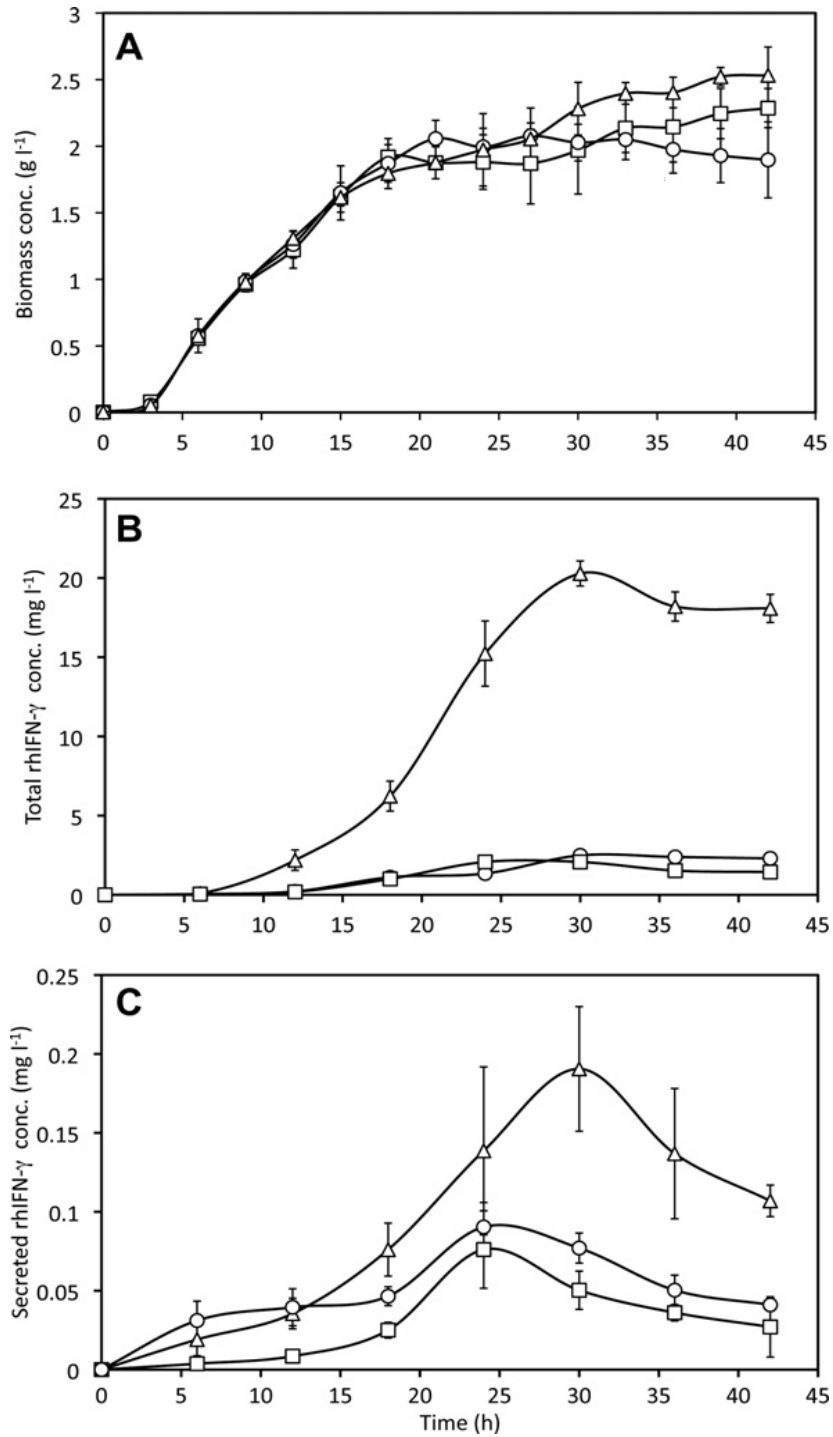


Figura 18. Cinéticas de crecimiento y producción de hIFN- γ por las cepas de WB600/pSpac-gam (□), WB600/pRep-gam (△) y WB600/plnt-gam (○) cultivadas en medio 2xL-Mal. (A) Concentración de biomasa; (B) Concentración total de hIFN- γ producido por las distintas cepas; (C) concentración del hIFN- γ secretado al medio de cultivo. Las barras indican la desviación estándar de tres experimentos independientes.

El análisis de western blot de la pastilla celular obtenida de las tres cepas obtenidas (Figura 19) muestra una banda principal de 19 kDa, la cual corresponde a la forma no procesada del hIFN- γ , indicando que la mayoría de la proteína se queda estancada en el citoplasma, además, se observa en todos los casos una banda de menor tamaño correspondiente a la masa molecular esperada de la proteína procesada apoyando la idea de que la maquinaria de secreción de *B. subtilis* se satura rápidamente. Las cepa WB600 transformada con los plásmidos pRep-gam y pSpac-gam producen un segundo producto de degradación, probablemente resultado una degradación proteolítica posterior (Figura 19). Un resultado similar fue obtenido por Medina-Rivero et al. (2007) que detectaron la forma procesada y sin procesar del hIL-2 fusionado con un péptido señal Tat-dependiente en la fracción insoluble de membrana de *E. coli*. Ellos concluyen que el sistema de secreción fue rápidamente saturado y que la secuencia señal del substrato acumulado es a menudo sensible a la acción de proteasas, lo que resulta en la digestión de la secuencia señal mientras que la proteína madura permanece intacta. Ya que como se mencionó, las maquinarias de secreción de *E. coli* y *B. subtilis* son altamente similares, se puede esperar un comportamiento similar con respecto al transporte de proteínas y procesamiento del péptido señal.

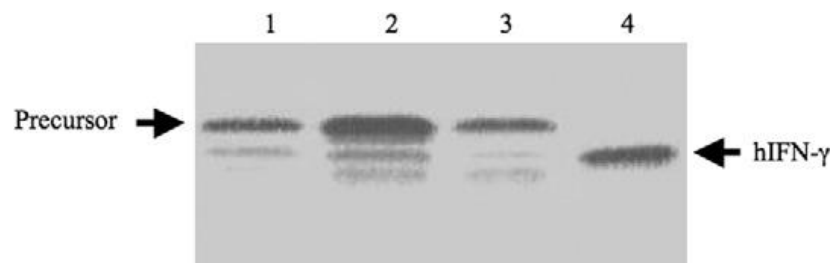


Figura 19. Inmunodetección del hIFN- γ en extractos celulares de distintas cepas de *B. subtilis* WB600 al tiempo máximo de producción. Líneas 1–3: WB600/pInt-gam, WB600/pRep-gam y WB600/pSpac-gam. Línea 4: estándar de hIFN- γ (PeproTech).

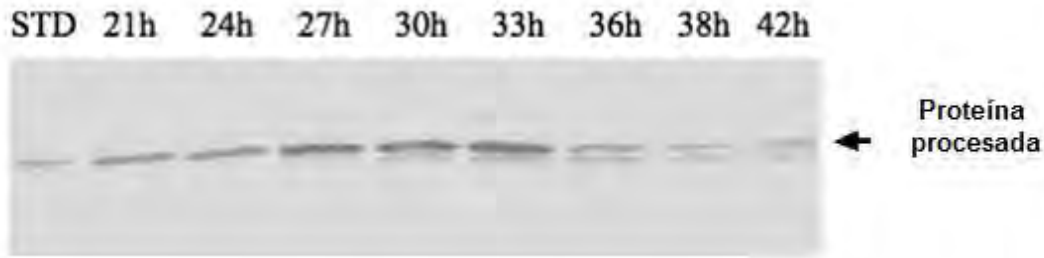


Figura 20. Inmunodetección del hIFN- γ en el medio de cultivo de *B. subtilis* WB600/pRep-gam. Línea 1: 20 ng de hIFN- γ estándar. Líneas 2–9 muestras de medio de cultivo tomado a diferentes tiempos.

El análisis mediante Western blot, del hIFN- γ secretado durante una cinética de 42 horas, demuestra la presencia de una banda única de 16.7 kDa hasta las 24 horas del cultivo, que corresponde al peso molecular esperado de la proteína madura (Figura 20). La presencia de esta banda sugiere fuertemente que la secuencia señal *amyL*-SAAA de *B. licheniformis* unida al hIFN- γ fue reconocida y procesada por las peptidasas señal de *B. subtilis*, sin embargo, a partir de las 27 horas, comienza a observarse una banda de menor tamaño, que indica que la proteína recombinante está siendo degradada, como puede observarse en la Figura 19 la degradación del hIFN- γ secretado coinciden con el comienzo de la fase de crecimiento estacionario. Es bien sabido que al final de la fase de crecimiento exponencial, cuando los nutrientes comienzan a disminuir, *B. subtilis* produce proteasas, lipasas y otras enzimas degradativas (Hamoen et al, 2003).

Aunque *B. subtilis* WB600 es una cepa deficiente en seis proteasas extracelulares, aún posee 0.5% de la actividad proteolítica extracelular. Esta cepa ha sido usada para la producción de β -lactamasa, estreptocinasa, y el fragmento del anticuerpo antidigoxigenina (Westers et al, 2004), sin embargo nuestros resultados sugieren que el hIFN- γ es sensible a proteasas intra y extracelulares. El uso de la cepa de *B. subtilis* WB800, que además de las seis proteasas extracelulares ausentes en la cepa WB600, también carece de las proteasas Vpr y WprA resulta en un incremento significativo en la secreción de hIL-3, comparado a la concentración obtenida con la cepa WB600 (Westers et al, 2006).

A nuestro saber, este es el primer reporte en el que se muestra la producción de hIFN- γ usando un gen sintético integrado en el genoma de *B. subtilis*. Aunque la producción de hIFN- γ en *B. subtilis* usando el plásmido integrativo pInt-gam fue 10 veces menor que el obtenido con el uso del plásmido replicativo pRep-gam, se debe remarcar que la construcción integrativa solo inserta una copia del gen *hIFN- γ* en el locus *lacA* del cromosoma de *B. subtilis*, mientras que el número de copias del plásmido replicativo puede variar de aproximadamente 50 a 100 copias por célula (Wu & Wong, 1999). Por lo que nosotros consideramos que la integración de varias copias de los genes de interés utilizando distintos *loci* de *B. subtilis* puede ser una alternativa viable para producir grandes cantidades de proteínas recombinantes, además, que este tipo de construcciones, pueden evitar la inestabilidad segregacional que muestran los plásmidos replicativos, otro de los principales problemas que muestra *B. subtilis* como sistema de expresión (Wang et al, 2004).

Por último, el sistema de secreción de hIFN- γ basado en *B. subtilis* construido en este proyecto, se sugiere, puede ser utilizado como un probiótico funcionalizado para la liberación de hIFN- γ en el tracto gastrointestinal para el tratamiento de algunos tipos de cáncer, disentería amebiana o diarrea por rotavirus en infantes. El uso de *B. subtilis* como probiótico no es nuevo, de hecho, una cepa de *B. subtilis* con actividades antivirales y anti-tumorales que secreta hIFN- α 2, es comercializada actualmente bajo el nombre de Subalin (Beliavskaia et al, 2003). Sin embargo, en nuestro caso todavía será necesario realizarse pruebas previas de efectividad y seguridad clínicas.

5. Conclusiones

Los resultados presentados en este trabajo mostraron que *B. subtilis* puede ser una alternativa para la producción de algunas proteínas recombinantes con intereses farmacéuticos, ya que se logra una producción aceptable de hIFN- γ usando a este microorganismo como sistema de producción.

La ineficiencia en la translocación de la proteína hIL-2 al medio de cultivo, puede deberse a la naturaleza de la misma.

Las citocininas hIL-2 y hIFN- γ , pueden ser objeto de degradación, por la actividad proteolítica residual que posee la cepa de *B. subtilis* WB600.

Los estudios de producción utilizando como modelos las citocininas hIL-2 y hIFN- γ , indican que el sistema de secreción de *B. subtilis* se satura rápidamente.

El uso de un sistema integrativo puede ser una alternativa útil para la producción de proteínas recombinantes en *B. subtilis*.

6. Referencias

- Akita M, Sasaki S, Matsuyama S, Mizushima S (1990) SecA interacts with secretory proteins by recognizing the positive charge at the amino terminus of the signal peptide in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **265**(14): 8164-8169
- Angelini S, Deitermann S, Koch HG (2005) FtsY, the bacterial signal-recognition particle receptor, interacts functionally and physically with the SecYEG translocon. *EMBO Rep* **6**(5): 476-481
- Antelmann H, Darmon E, Noone D, Veening JW, Westers H, Bron S, Kuipers OP, Devine KM, Hecker M, van Dijl JM (2003) The extracellular proteome of *Bacillus subtilis* under secretion stress conditions. *Mol Microbiol* **49**(1): 143-156
- Antelmann H, Scharf C, Hecker M (2000) Phosphate starvation-inducible proteins of *Bacillus subtilis*: proteomics and transcriptional analysis. *J Bacteriol* **182**(16): 4478-4490
- Antelmann H, Tjalsma H, Voigt B, Ohlmeier S, Bron S, van Dijl JM, Hecker M (2001) A proteomic view on genome-based signal peptide predictions. *Genome Res* **11**(9): 1484-1502
- Antelmann H, Yamamoto H, Sekiguchi J, Hecker M (2002) Stabilization of cell wall proteins in *Bacillus subtilis*: a proteomic approach. *Proteomics* **2**(5): 591-602
- Babe LM, Schmidt B (1998) Purification and biochemical analysis of WprA, a 52-kDa serine protease secreted by *B. subtilis* as an active complex with its 23-kDa propeptide. *Biochim Biophys Acta* **1386**(1): 211-219
- Bajwa EK, Ayas NT, Schulzer M, Mak E, Ryu JH, Malhotra A (2005) Interferon-gamma1b therapy in idiopathic pulmonary fibrosis: a metaanalysis. *Chest* **128**(1): 203-206
- Balderas Hernández V, Paz Maldonado L, Medina Rivero E, Barba de la Rosa A, Ordoñez Acevedo L, De León Rodríguez A (2008) Optimization of human interferon gamma production in *Escherichia coli* by response surface methodology. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* **13**(1): 7-13
- Beliavskaia VA, Cherdyntseva NV, Bondarenko VM, Litviakov NV (2003) [Biological effects of interferon, produced by recombinant bacteria of the probiotic preparation subalin]. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol*(2): 102-109
- Bengtsson J, Tjalsma H, Rivolta C, Hederstedt L (1999) Subunit II of *Bacillus subtilis* cytochrome c oxidase is a lipoprotein. *J Bacteriol* **181**(2): 685-688
- Bernstein HD, Poritz MA, Strub K, Hoben PJ, Brenner S, Walter P (1989) Model for signal sequence recognition from amino-acid sequence of 54K subunit of signal recognition particle. *Nature* **340**(6233): 482-486
- Blackman SA, Smith TJ, Foster SJ (1998) The role of autolysins during vegetative growth of *Bacillus subtilis* 168. *Microbiology* **144** (Pt 1): 73-82

Bochkareva ES, Lissin NM, Girshovich AS (1988) Transient association of newly synthesized unfolded proteins with the heat-shock GroEL protein. *Nature* **336**(6196): 254-257

Boe L, Gros MF, te Riele H, Ehrlich SD, Gruss A (1989) Replication origins of single-stranded-DNA plasmid pUB110. *J Bacteriol* **171**(6): 3366-3372

Bogsch EG, Sargent F, Stanley NR, Berks BC, Robinson C, Palmer T (1998) An essential component of a novel bacterial protein export system with homologues in plastids and mitochondria. *J Biol Chem* **273**(29): 18003-18006

Bolhuis A, Broekhuizen CP, Sorokin A, van Roosmalen ML, Venema G, Bron S, Quax WJ, van Dijl JM (1998) SecDF of *Bacillus subtilis*, a molecular Siamese twin required for the efficient secretion of proteins. *J Biol Chem* **273**(33): 21217-21224

Bolhuis A, Matzen A, Hyyrylainen HL, Kontinen VP, Meima R, Chapuis J, Venema G, Bron S, Freudl R, van Dijl JM (1999a) Signal peptide peptidase- and ClpP-like proteins of *Bacillus subtilis* required for efficient translocation and processing of secretory proteins. *J Biol Chem* **274**(35): 24585-24592

Bolhuis A, Tjalsma H, Smith HE, de Jong A, Meima R, Venema G, Bron S, van Dijl JM (1999b) Evaluation of bottlenecks in the late stages of protein secretion in *Bacillus subtilis*. *Appl Environ Microbiol* **65**(7): 2934-2941

Bolhuis A, Tjalsma H, Stephenson K, Harwood CR, Venema G, Bron S, van Dijl JM (1999c) Different mechanisms for thermal inactivation of *Bacillus subtilis* signal peptidase mutants. *J Biol Chem* **274**(22): 15865-15868

Briggs MS, Cornell DG, Dluhy RA, Gierasch LM (1986) Conformations of signal peptides induced by lipids suggest initial steps in protein export. *Science* **233**(4760): 206-208

Bron S, Holsappel S, Venema G, Peeters BP (1991) Plasmid deletion formation between short direct repeats in *Bacillus subtilis* is stimulated by single-stranded rolling-circle replication intermediates. *Mol Gen Genet* **226**(1-2): 88-96

Bron S, Luxen E (1985) Segregational instability of pUB110-derived recombinant plasmids in *Bacillus subtilis*. *Plasmid* **14**(3): 235-244

Collier DN (1994) *Escherichia coli* signal peptides direct inefficient secretion of an outer membrane protein (OmpA) and periplasmic proteins (maltose-binding protein, ribose-binding protein, and alkaline phosphatase) in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **176**(10): 3013-3020

Chaddock AM, Mant A, Karnauchov I, Brink S, Herrmann RG, Klosgen RB, Robinson C (1995) A new type of signal peptide: central role of a twin-arginine motif in transfer signals for the delta pH-dependent thylakoidal protein translocase. *EMBO J* **14**(12): 2715-2722

Chung YS, Breidt F, Dubnau D (1998) Cell surface localization and processing of the ComG proteins, required for DNA binding during transformation of *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **29**(3): 905-913

Chung YS, Dubnau D (1995) ComC is required for the processing and translocation of comGC, a pilin-like competence protein of *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **15**(3): 543-551

Dalbey RE, Lively MO, Bron S, van Dijl JM (1997) The chemistry and enzymology of the type I signal peptidases. *Protein Sci* **6**(6): 1129-1138

Dalbey RE, Von Heijne G (1992) Signal peptidases in prokaryotes and eukaryotes--a new protease family. *Trends Biochem Sci* **17**(11): 474-478

Darmon E, Noone D, Masson A, Bron S, Kuipers OP, Devine KM, van Dijl JM (2002) A novel class of heat and secretion stress-responsive genes is controlled by the autoregulated CsrRS two-component system of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **184**(20): 5661-5671

de Vrije GJ, Batenburg AM, Killian JA, de Kruijff B (1990) Lipid involvement in protein translocation in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **4**(1): 143-150

Dorenbos R, Stein T, Kabel J, Bruand C, Bolhuis A, Bron S, Quax WJ, Van Dijl JM (2002) Thiol-disulfide oxidoreductases are essential for the production of the lantibiotic sublancin 168. *J Biol Chem* **277**(19): 16682-16688

Driessen AJ, Manting EH, van der Does C (2001) The structural basis of protein targeting and translocation in bacteria. *Nat Struct Biol* **8**(6): 492-498

Dubnau D (1991) Genetic competence in *Bacillus subtilis*. *Microbiol Rev* **55**(3): 395-424

Duitman EH, Hamoen LW, Rembold M, Venema G, Seitz H, Saenger W, Bernhard F, Reinhardt R, Schmidt M, Ullrich C, Stein T, Leenders F, Vater J (1999) The mycosubtilin synthetase of *Bacillus subtilis* ATCC6633: a multifunctional hybrid between a peptide synthetase, an amino transferase, and a fatty acid synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(23): 13294-13299

Economou A (1998) Bacterial preprotein translocase: mechanism and conformational dynamics of a processive enzyme. *Mol Microbiol* **27**(3): 511-518

Economou A (2002) Bacterial secretome: the assembly manual and operating instructions (Review). *Mol Membr Biol* **19**(3): 159-169

Eichler J, Moll R (2001) The signal recognition particle of Archaea. *Trends Microbiol* **9**(3): 130-136

Fahnestock SR, Fisher KE (1986) Expression of the staphylococcal protein A gene in *Bacillus subtilis* by gene fusions utilizing the promoter from a *Bacillus amyloliquefaciens* alpha-amylase gene. *J Bacteriol* **165**(3): 796-804

Fekkes P, Driessen AJ (1999) Protein targeting to the bacterial cytoplasmic membrane. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**(1): 161-173

Foster SJ (1993) Molecular analysis of three major wall-associated proteins of *Bacillus subtilis* 168: evidence for processing of the product of a gene encoding a 258 kDa precursor two-domain ligand-binding protein. *Mol Microbiol* **8**(2): 299-310

- Galli G, Rodriguez F, Cosmina P, Pratesi C, Nogarotto R, de Ferra F, Grandi G (1994) Characterization of the surfactin synthetase multi-enzyme complex. *Biochim Biophys Acta* **1205**(1): 19-28
- Gennity JM, Inouye M (1991) Protein secretion in bacteria. *Curr Opin Biotechnol* **2**(5): 661-667
- Grossman AD (1995) Genetic networks controlling the initiation of sporulation and the development of genetic competence in *Bacillus subtilis*. *Annu Rev Genet* **29**: 477-508
- Gustafsson C, Govindarajan S, Minshull J (2004) Codon bias and heterologous protein expression. *Trends Biotechnol* **22**(7): 346-353
- Haima P, Bron S, Venema G (1990) Novel plasmid marker rescue transformation system for molecular cloning in *Bacillus subtilis* enabling direct selection of recombinants. *Mol Gen Genet* **223**(2): 185-191
- Hamoen LW, Venema G, Kuipers OP (2003) Controlling competence in *Bacillus subtilis*: shared use of regulators. *Microbiology* **149**(Pt 1): 9-17
- Hartl B, Wehrl W, Wiegert T, Homuth G, Schumann W (2001) Development of a new integration site within the *Bacillus subtilis* chromosome and construction of compatible expression cassettes. *J Bacteriol* **183**(8): 2696-2699
- Havarstein LS, Diep DB, Nes IF (1995) A family of bacteriocin ABC transporters carry out proteolytic processing of their substrates concomitant with export. *Mol Microbiol* **16**(2): 229-240
- Hesterkamp T, Hauser S, Lutcke H, Bukau B (1996) *Escherichia coli* trigger factor is a prolyl isomerase that associates with nascent polypeptide chains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(9): 4437-4441
- Hikita C, Mizushima S (1992a) Effects of total hydrophobicity and length of the hydrophobic domain of a signal peptide on in vitro translocation efficiency. *J Biol Chem* **267**(7): 4882-4888
- Hikita C, Mizushima S (1992b) The requirement of a positive charge at the amino terminus can be compensated for by a longer central hydrophobic stretch in the functioning of signal peptides. *J Biol Chem* **267**(17): 12375-12379
- Hirose I, Sano K, Shioda I, Kumano M, Nakamura K, Yamane K (2000) Proteome analysis of *Bacillus subtilis* extracellular proteins: a two-dimensional protein electrophoretic study. *Microbiology* **146** (Pt 1): 65-75
- Honda K, Nakamura K, Nishiguchi M, Yamane K (1993) Cloning and characterization of a *Bacillus subtilis* gene encoding a homolog of the 54-kilodalton subunit of mammalian signal recognition particle and *Escherichia coli* Ffh. *J Bacteriol* **175**(15): 4885-4894
- Hyyrylainen HL, Bolhuis A, Darmon E, Muukkonen L, Koski P, Vitikainen M, Sarvas M, Pragai Z, Bron S, van Dijl JM, Kontinen VP (2001) A novel two-component regulatory

system in *Bacillus subtilis* for the survival of severe secretion stress. *Mol Microbiol* **41**(5): 1159-1172

Itaya M, Kondo K, Tanaka T (1989) A neomycin resistance gene cassette selectable in a single copy state in the *Bacillus subtilis* chromosome. *Nucleic Acids Res* **17**(11): 4410

Jacobs M, Andersen JB, Kontinen V, Sarvas M (1993) *Bacillus subtilis* PrsA is required in vivo as an extracytoplasmic chaperone for secretion of active enzymes synthesized either with or without pro-sequences. *Mol Microbiol* **8**(5): 957-966

Jan J, Valle F, Bolivar F, Merino E (2001) Construction of protein overproducer strains in *Bacillus subtilis* by an integrative approach. *Appl Microbiol Biotechnol* **55**(1): 69-75

Jongbloed JD, Antelmann H, Hecker M, Nijland R, Bron S, Airaksinen U, Pries F, Quax WJ, van Dijk JM, Braun PG (2002) Selective contribution of the twin-arginine translocation pathway to protein secretion in *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem* **277**(46): 44068-44078

Jongbloed JD, Grieger U, Antelmann H, Hecker M, Nijland R, Bron S, van Dijk JM (2004) Two minimal Tat translocases in *Bacillus*. *Mol Microbiol* **54**(5): 1319-1325

Jongbloed JD, Martin U, Antelmann H, Hecker M, Tjalsma H, Venema G, Bron S, van Dijk JM, Muller J (2000) TatC is a specificity determinant for protein secretion via the twin-arginine translocation pathway. *J Biol Chem* **275**(52): 41350-41357

Kawaguchi S, Muller J, Linde D, Kuramitsu S, Shibata T, Inoue Y, Vassilyev DG, Yokoyama S (2001) The crystal structure of the ttCsaA protein: an export-related chaperone from *Thermus thermophilus*. *EMBO J* **20**(3): 562-569

Keenan RJ, Freymann DM, Stroud RM, Walter P (2001) The signal recognition particle. *Annu Rev Biochem* **70**: 755-775

Khalilzadeh R, Shojaosadati SA, Bahrami A, Maghsoudi N (2003) Over-expression of recombinant human interferon-gamma in high cell density fermentation of *Escherichia coli*. *Biotechnol Lett* **25**(23): 1989-1992

Klein W, Marahiel MA (2002) Structure-function relationship and regulation of two *Bacillus subtilis* DNA-binding proteins, HBSu and AbrB. *J Mol Microbiol Biotechnol* **4**(3): 323-329

Kobayashi K, Ehrlich SD, Albertini A, Amati G, Andersen KK, Arnaud M, Asai K, Ashikaga S, Aymerich S, Bessieres P, Boland F, Brignell SC, Bron S, Bunai K, Chapuis J, Christiansen LC, Danchin A, Debarbouille M, Dervyn E, Deuerling E, Devine K, Devine SK, Dreesen O, Errington J, Fillinger S, Foster SJ, Fujita Y, Galizzi A, Gardan R, Eschevins C, Fukushima T, Haga K, Harwood CR, Hecker M, Hosoya D, Hullo MF, Kakeshita H, Karamata D, Kasahara Y, Kawamura F, Koga K, Koski P, Kuwana R, Imamura D, Ishimaru M, Ishikawa S, Ishio I, Le Coq D, Masson A, Mauel C, Meima R, Mellado RP, Moir A, Moriya S, Nagakawa E, Nanamiya H, Nakai S, Nygaard P, Ogura M, Ohanan T, O'Reilly M, O'Rourke M, Pragai Z, Pooley HM, Rapoport G, Rawlins JP, Rivas LA, Rivolta C, Sadaie A, Sadaie Y, Sarvas M, Sato T, Saxild HH, Scanlan E, Schumann W, Seegers JF, Sekiguchi J, Sekowska A, Seror SJ, Simon M, Stragier P, Studer R, Takamatsu H, Tanaka T, Takeuchi M, Thomaidis HB, Vagner V, van Dijk JM, Watabe K, Wipat A, Yamamoto H, Yamamoto M, Yamamoto Y, Yamane K, Yata K, Yoshida K,

- Yoshikawa H, Zuber U, Ogasawara N (2003) Essential *Bacillus subtilis* genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(8): 4678-4683
- Kontinen VP, Saris P, Sarvas M (1991) A gene (prsA) of *Bacillus subtilis* involved in a novel, late stage of protein export. *Mol Microbiol* **5**(5): 1273-1283
- Kontinen VP, Sarvas M (1993) The PrsA lipoprotein is essential for protein secretion in *Bacillus subtilis* and sets a limit for high-level secretion. *Mol Microbiol* **8**(4): 727-737
- Koshland D, Botstein D (1980) Secretion of beta-lactamase requires the carboxy end of the protein. *Cell* **20**(3): 749-760
- Kumamoto CA, Francetic O (1993) Highly selective binding of nascent polypeptides by an *Escherichia coli* chaperone protein in vivo. *J Bacteriol* **175**(8): 2184-2188
- Kunst F, Ogasawara N, Moszer I, Albertini AM, Alloni G, Azevedo V, Bertero MG, Bessieres P, Bolotin A, Borchert S, Borriss R, Boursier L, Brans A, Braun M, Brignell SC, Bron S, Brouillet S, Bruschi CV, Caldwell B, Capuano V, Carter NM, Choi SK, Codani JJ, Connerton IF, Danchin A, et al. (1997) The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* **390**(6657): 249-256
- Kusukawa N, Yura T, Ueguchi C, Akiyama Y, Ito K (1989) Effects of mutations in heat-shock genes groES and groEL on protein export in *Escherichia coli*. *EMBO J* **8**(11): 3517-3521
- Lacks SA, Lopez P, Greenberg B, Espinosa M (1986) Identification and analysis of genes for tetracycline resistance and replication functions in the broad-host-range plasmid pLS1. *J Mol Biol* **192**(4): 753-765
- Lam KH, Chow KC, Wong WK (1998) Construction of an efficient *Bacillus subtilis* system for extracellular production of heterologous proteins. *J Biotechnol* **63**(3): 167-177
- Lamiet AA, Pluckthun A (1989) The precursor of beta-lactamase: purification, properties and folding kinetics. *EMBO J* **8**(5): 1469-1477
- Lee HC, Bernstein HD (2001) The targeting pathway of *Escherichia coli* presecretory and integral membrane proteins is specified by the hydrophobicity of the targeting signal. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(6): 3471-3476
- Lesuisse E, Schanck K, Colson C (1993) Purification and preliminary characterization of the extracellular lipase of *Bacillus subtilis* 168, an extremely basic pH-tolerant enzyme. *Eur J Biochem* **216**(1): 155-160
- Liu G, Topping TB, Randall LL (1989) Physiological role during export for the retardation of folding by the leader peptide of maltose-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(23): 9213-9217
- Lory S, Strom MS (1997) Structure-function relationship of type-IV prepilin peptidase of *Pseudomonas aeruginosa*--a review. *Gene* **192**(1): 117-121

Luirink J, Samuelsson T, de Gier JW (2001) YidC/Oxa1p/Alb3: evolutionarily conserved mediators of membrane protein assembly. *FEBS Lett* **501**(1): 1-5

Luirink J, Sinning I (2004) SRP-mediated protein targeting: structure and function revisited. *Biochim Biophys Acta* **1694**(1-3): 17-35

Madyastha PR, Yang S, Ries WL, Key LL, Jr. (2000) IFN-gamma enhances osteoclast generation in cultures of peripheral blood from osteopetrotic patients and normalizes superoxide production. *J Interferon Cytokine Res* **20**(7): 645-652

Marciano BE, Rosenzweig SD, Kleiner DE, Anderson VL, Darnell DN, Anaya-O'Brien S, Hilligoss DM, Malech HL, Gallin JI, Holland SM (2004) Gastrointestinal involvement in chronic granulomatous disease. *Pediatrics* **114**(2): 462-468

Margot P, Karamata D (1996) The wprA gene of *Bacillus subtilis* 168, expressed during exponential growth, encodes a cell-wall-associated protease. *Microbiology* **142** (Pt 12): 3437-3444

McAuliffe O, Ross RP, Hill C (2001) Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiol Rev* **25**(3): 285-308

Medina-Rivero E, Balderas-Hernandez VE, Ordonez-Acevedo LG, Paz-Maldonado LM, Barba-De la Rosa AP, De Leon-Rodriguez A (2007) Modified penicillin acylase signal peptide allows the periplasmic production of soluble human interferon-gamma but not of soluble human interleukin-2 by the Tat pathway in *Escherichia coli*. *Biotechnol Lett* **29**(9): 1369-1374

Meijer WJ, van der Lelie D, Venema G, Bron S (1995) Effects of the generation of single-stranded DNA on the maintenance of plasmid pMV158 and derivatives in different *Bacillus subtilis* strains. *Plasmid* **33**(2): 79-89

Meima R, Eschevins C, Fillinger S, Bolhuis A, Hamoen LW, Dorenbos R, Quax WJ, van Dijl JM, Provvedi R, Chen I, Dubnau D, Bron S (2002) The bdbDC operon of *Bacillus subtilis* encodes thiol-disulfide oxidoreductases required for competence development. *J Biol Chem* **277**(9): 6994-7001

Merchante R, Pooley HM, Karamata D (1995) A periplasm in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **177**(21): 6176-6183

Moir A, Kemp EH, Robinson C, Corfe BM (1994) The genetic analysis of bacterial spore germination. *J Appl Bacteriol* **77**(3): 9S-16S

Moks T, Abrahmsen L, Holmgren E, Bilich M, Olsson A, Uhlen M, Pohl G, Sterky C, Hultberg H, Josephson S, et al. (1987) Expression of human insulin-like growth factor I in bacteria: use of optimized gene fusion vectors to facilitate protein purification. *Biochemistry* **26**(17): 5239-5244

Mori H, Ito K (2001) The Sec protein-translocation pathway. *Trends Microbiol* **9**(10): 494-500

Mould RM, Shackleton JB, Robinson C (1991) Transport of proteins into chloroplasts. Requirements for the efficient import of two luminal oxygen-evolving complex proteins into isolated thylakoids. *J Biol Chem* **266**(26): 17286-17289

Muller J, Walter F, van Dijl JM, Behnke D (1992) Suppression of the growth and export defects of an *Escherichia coli* secA(Ts) mutant by a gene cloned from *Bacillus subtilis*. *Mol Gen Genet* **235**(1): 89-96

Muller JP, Bron S, Venema G, van Dijl JM (2000a) Chaperone-like activities of the CsaA protein of *Bacillus subtilis*. *Microbiology* **146** (Pt 1): 77-88

Muller JP, Ozegowski J, Vettermann S, Swaving J, Van Wely KH, Driessen AJ (2000b) Interaction of *Bacillus subtilis* CsaA with SecA and precursor proteins. *Biochem J* **348** Pt 2: 367-373

Murray T, Popham DL, Setlow P (1997) Identification and characterization of pbpA encoding *Bacillus subtilis* penicillin-binding protein 2A. *J Bacteriol* **179**(9): 3021-3029

Nakamura K, Imai Y, Nakamura A, Yamane K (1992) Small cytoplasmic RNA of *Bacillus subtilis*: functional relationship with human signal recognition particle 7S RNA and *Escherichia coli* 4.5S RNA. *J Bacteriol* **174**(7): 2185-2192

Nakamura K, Nishiguchi M, Honda K, Yamane K (1994) The *Bacillus subtilis* SRP54 homologue, Ffh, has an intrinsic GTPase activity and forms a ribonucleoprotein complex with small cytoplasmic RNA in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* **199**(3): 1394-1399

Nakamura K, Yahagi S, Yamazaki T, Yamane K (1999) *Bacillus subtilis* histone-like protein, HBSu, is an integral component of a SRP-like particle that can bind the Alu domain of small cytoplasmic RNA. *J Biol Chem* **274**(19): 13569-13576

Nakano MM, Zuber P (1990) Molecular biology of antibiotic production in *Bacillus*. *Crit Rev Biotechnol* **10**(3): 223-240

Noone D, Howell A, Collery R, Devine KM (2001) YkdA and YvtA, HtrA-like serine proteases in *Bacillus subtilis*, engage in negative autoregulation and reciprocal cross-regulation of ykdA and yvtA gene expression. *J Bacteriol* **183**(2): 654-663

Nouwen N, Driessen AJ (2002) SecDFyajC forms a heterotetrameric complex with YidC. *Mol Microbiol* **44**(5): 1397-1405

Novick RP, Iordanescu S, Projan SJ, Kornblum J, Edelman I (1989) pT181 plasmid replication is regulated by a countertranscript-driven transcriptional attenuator. *Cell* **59**(2): 395-404

Oguro A, Kakeshita H, Honda K, Takamatsu H, Nakamura K, Yamane K (1995) srb: a *Bacillus subtilis* gene encoding a homologue of the alpha-subunit of the mammalian signal recognition particle receptor. *DNA Res* **2**(2): 95-100

Olmos-Soto J, Contreras-Flores R (2003) Genetic system constructed to overproduce and secrete proinsulin in *Bacillus subtilis*. *Appl Microbiol Biotechnol* **62**(4): 369-373

- Paetzel M, Dalbey RE, Strynadka NC (1998) Crystal structure of a bacterial signal peptidase in complex with a beta-lactam inhibitor. *Nature* **396**(6707): 186-190
- Paik SH, Chakicherla A, Hansen JN (1998) Identification and characterization of the structural and transporter genes for, and the chemical and biological properties of, sublancin 168, a novel lantibiotic produced by *Bacillus subtilis* 168. *J Biol Chem* **273**(36): 23134-23142
- Palva I (1982) Molecular cloning of alpha-amylase gene from *Bacillus amyloliquefaciens* and its expression in *B. subtilis*. *Gene* **19**(1): 81-87
- Palva I, Lehtovaara P, Kaariainen L, Sibakov M, Cantell K, Schein CH, Kashiwagi K, Weissmann C (1983) Secretion of interferon by *Bacillus subtilis*. *Gene* **22**(2-3): 229-235
- Park S, Liu G, Topping TB, Cover WH, Randall LL (1988) Modulation of folding pathways of exported proteins by the leader sequence. *Science* **239**(4843): 1033-1035
- Peterson JH, Woolhead CA, Bernstein HD (2003) Basic amino acids in a distinct subset of signal peptides promote interaction with the signal recognition particle. *J Biol Chem* **278**(46): 46155-46162
- Petsch D, Anspach FB (2000) Endotoxin removal from protein solutions. *J Biotechnol* **76**(2-3): 97-119
- Pohlschroder M, Prinz WA, Hartmann E, Beckwith J (1997) Protein translocation in the three domains of life: variations on a theme. *Cell* **91**(5): 563-566
- Pooley HM, Merchante R, Karamata D (1996) Overall protein content and induced enzyme components of the periplasm of *Bacillus subtilis*. *Microb Drug Resist* **2**(1): 9-15
- Popham DL, Helin J, Costello CE, Setlow P (1996) Analysis of the peptidoglycan structure of *Bacillus subtilis* endospores. *J Bacteriol* **178**(22): 6451-6458
- Pragai Z, Tjalsma H, Bolhuis A, van Dijk JM, Venema G, Bron S (1997) The signal peptidase II (Isp) gene of *Bacillus subtilis*. *Microbiology* **143** (Pt 4): 1327-1333
- Priest FG (1977) Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. *Bacteriol Rev* **41**(3): 711-753
- Pugsley AP (1993) The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. *Microbiol Rev* **57**(1): 50-108
- Reyes DY, Yoshikawa H (2002) DnaK chaperone machine and trigger factor are only partially required for normal growth of *Bacillus subtilis*. *Biosci Biotechnol Biochem* **66**(7): 1583-1586
- Riezman H (1997) The ins and outs of protein translocation. *Science* **278**(5344): 1728-1729
- Robinson C, Cai D, Hulford A, Brock IW, Michl D, Hazell L, Schmidt I, Herrmann RG, Klosgen RB (1994) The presequence of a chimeric construct dictates which of two

mechanisms are utilized for translocation across the thylakoid membrane: evidence for the existence of two distinct translocation systems. *EMBO J* **13**(2): 279-285

Romisch K, Webb J, Herz J, Prehn S, Frank R, Vingron M, Dobberstein B (1989) Homology of 54K protein of signal-recognition particle, docking protein and two *E. coli* proteins with putative GTP-binding domains. *Nature* **340**(6233): 478-482

Rudd KE, Sofia HJ, Koonin EV, Plunkett G, 3rd, Lazar S, Rouviere PE (1995) A new family of peptidyl-prolyl isomerases. *Trends Biochem Sci* **20**(1): 12-14

Sahl HG, Jack RW, Bierbaum G (1995) Biosynthesis and biological activities of lantibiotics with unique post-translational modifications. *Eur J Biochem* **230**(3): 827-853

Samuelson JC, Chen M, Jiang F, Moller I, Wiedmann M, Kuhn A, Phillips GJ, Dalbey RE (2000) YidC mediates membrane protein insertion in bacteria. *Nature* **406**(6796): 637-641

Sargent F, Stanley NR, Berks BC, Palmer T (1999) Sec-independent protein translocation in *Escherichia coli*. A distinct and pivotal role for the TatB protein. *J Biol Chem* **274**(51): 36073-36082

Sarvas M, Harwood CR, Bron S, van Dijl JM (2004) Post-translocational folding of secretory proteins in Gram-positive bacteria. *Biochim Biophys Acta* **1694**(1-3): 311-327

Scotti PA, Urbanus ML, Brunner J, de Gier JW, von Heijne G, van der Does C, Driessen AJ, Oudega B, Luirink J (2000) YidC, the *Escherichia coli* homologue of mitochondrial Oxa1p, is a component of the Sec translocase. *EMBO J* **19**(4): 542-549

Schatz G, Dobberstein B (1996) Common principles of protein translocation across membranes. *Science* **271**(5255): 1519-1526

Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA (2004) Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol* **75**(2): 163-189

Simonen M, Palva I (1993) Protein secretion in *Bacillus* species. *Microbiol Rev* **57**(1): 109-137

Stragier P, Bonamy C, Karmazyn-Campelli C (1988) Processing of a sporulation sigma factor in *Bacillus subtilis*: how morphological structure could control gene expression. *Cell* **52**(5): 697-704

Stragier P, Losick R (1996) Molecular genetics of sporulation in *Bacillus subtilis*. *Annu Rev Genet* **30**: 297-241

Tjalsma H, Antelmann H, Jongbloed JD, Braun PG, Darmon E, Dorenbos R, Dubois JY, Westers H, Zanen G, Quax WJ, Kuipers OP, Bron S, Hecker M, van Dijl JM (2004) Proteomics of protein secretion by *Bacillus subtilis*: separating the "secrets" of the secretome. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**(2): 207-233

Tjalsma H, Bolhuis A, Jongbloed JD, Bron S, van Dijl JM (2000) Signal peptide-dependent protein transport in *Bacillus subtilis*: a genome-based survey of the secretome. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**(3): 515-547

Tjalsma H, Bolhuis A, van Roosmalen ML, Wiegert T, Schumann W, Broekhuizen CP, Quax WJ, Venema G, Bron S, van Dijl JM (1998) Functional analysis of the secretory precursor processing machinery of *Bacillus subtilis*: identification of a eubacterial homolog of archaeal and eukaryotic signal peptidases. *Genes Dev* **12**(15): 2318-2331

Tjalsma H, Bron S, van Dijl JM (2003) Complementary impact of paralogous Oxa1-like proteins of *Bacillus subtilis* on post-translocational stages in protein secretion. *J Biol Chem* **278**(18): 15622-15632

Tjalsma H, Kontinen VP, Pragai Z, Wu H, Meima R, Venema G, Bron S, Sarvas M, van Dijl JM (1999a) The role of lipoprotein processing by signal peptidase II in the Gram-positive eubacterium *Bacillus subtilis*. Signal peptidase II is required for the efficient secretion of alpha-amylase, a non-lipoprotein. *J Biol Chem* **274**(3): 1698-1707

Tjalsma H, Noback MA, Bron S, Venema G, Yamane K, van Dijl JM (1997) *Bacillus subtilis* contains four closely related type I signal peptidases with overlapping substrate specificities. Constitutive and temporally controlled expression of different sip genes. *J Biol Chem* **272**(41): 25983-25992

Tjalsma H, Zanen G, Venema G, Bron S, van Dijl JM (1999b) The potential active site of the lipoprotein-specific (type II) signal peptidase of *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem* **274**(40): 28191-28197

Valent QA, de Gier JW, von Heijne G, Kendall DA, ten Hagen-Jongman CM, Oudega B, Luirink J (1997) Nascent membrane and presecretory proteins synthesized in *Escherichia coli* associate with signal recognition particle and trigger factor. *Mol Microbiol* **25**(1): 53-64

Valent QA, Kendall DA, High S, Kusters R, Oudega B, Luirink J (1995) Early events in preprotein recognition in *E. coli*: interaction of SRP and trigger factor with nascent polypeptides. *EMBO J* **14**(22): 5494-5505

van der Meer JR, Rollema HS, Siezen RJ, Beerthuyzen MM, Kuipers OP, de Vos WM (1994) Influence of amino acid substitutions in the nisin leader peptide on biosynthesis and secretion of nisin by *Lactococcus lactis*. *J Biol Chem* **269**(5): 3555-3562

van Dijl JM, Braun PG, Robinson C, Quax WJ, Antelmann H, Hecker M, Muller J, Tjalsma H, Bron S, Jongbloed JD (2002) Functional genomic analysis of the *Bacillus subtilis* Tat pathway for protein secretion. *J Biotechnol* **98**(2-3): 243-254

van Kraaij C, de Vos WM, Siezen RJ, Kuipers OP (1999) Lantibiotics: biosynthesis, mode of action and applications. *Nat Prod Rep* **16**(5): 575-587

van Roosmalen ML, Geukens N, Jongbloed JD, Tjalsma H, Dubois JY, Bron S, van Dijl JM, Anne J (2004) Type I signal peptidases of Gram-positive bacteria. *Biochim Biophys Acta* **1694**(1-3): 279-297

van Wely KH, Swaving J, Freudl R, Driessen AJ (2001) Translocation of proteins across the cell envelope of Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **25**(4): 437-454

- Venema R, Tjalsma H, van Dijk JM, de Jong A, Leenhouts K, Buist G, Venema G (2003) Active lipoprotein precursors in the Gram-positive eubacterium *Lactococcus lactis*. *J Biol Chem* **278**(17): 14739-14746
- von Heijne G (1984) How signal sequences maintain cleavage specificity. *J Mol Biol* **173**(2): 243-251
- von Heijne G (1986) Net N-C charge imbalance may be important for signal sequence function in bacteria. *J Mol Biol* **192**(2): 287-290
- von Heijne G (1990a) Protein targeting signals. *Curr Opin Cell Biol* **2**(4): 604-608
- von Heijne G (1990b) The signal peptide. *J Membr Biol* **115**(3): 195-201
- von Heijne G (1992) Membrane protein structure prediction. Hydrophobicity analysis and the positive-inside rule. *J Mol Biol* **225**(2): 487-494
- von Heijne G (1994) Sec-independent protein insertion into the inner *E. coli* membrane. A phenomenon in search of an explanation. *FEBS Lett* **346**(1): 69-72
- von Heijne G (1998) Life and death of a signal peptide. *Nature* **396**(6707): 111, 113
- von Heijne G, Abrahmsen L (1989) Species-specific variation in signal peptide design. Implications for protein secretion in foreign hosts. *FEBS Lett* **244**(2): 439-446
- Wahlstrom E, Vitikainen M, Kontinen VP, Sarvas M (2003) The extracytoplasmic folding factor PrsA is required for protein secretion only in the presence of the cell wall in *Bacillus subtilis*. *Microbiology* **149**(Pt 3): 569-577
- Wang JJ, Rojanatavorn K, Shih JC (2004) Increased production of *Bacillus* keratinase by chromosomal integration of multiple copies of the kerA gene. *Biotechnol Bioeng* **87**(4): 459-464
- Watanabe M, Blobel G (1989) SecB functions as a cytosolic signal recognition factor for protein export in *E. coli*. *Cell* **58**(4): 695-705
- Weinrauch Y, Dubnau D (1983) Plasmid marker rescue transformation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **154**(3): 1077-1087
- Westers L, Dijkstra DS, Westers H, van Dijk JM, Quax WJ (2006) Secretion of functional human interleukin-3 from *Bacillus subtilis*. *J Biotechnol* **123**(2): 211-224
- Westers L, Westers H, Quax WJ (2004) *Bacillus subtilis* as cell factory for pharmaceutical proteins: a biotechnological approach to optimize the host organism. *Biochim Biophys Acta* **1694**(1-3): 299-310
- Wild J, Altman E, Yura T, Gross CA (1992) DnaK and DnaJ heat shock proteins participate in protein export in *Escherichia coli*. *Genes Dev* **6**(7): 1165-1172
- Wild J, Rossmeissl P, Walter WA, Gross CA (1996) Involvement of the DnaK-DnaJ-GrpE chaperone team in protein secretion in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **178**(12): 3608-3613

Wu SC, Wong SL (1999) Development of improved pUB110-based vectors for expression and secretion studies in *Bacillus subtilis*. *J Biotechnol* **72**(1-2): 185-195

Wu SC, Wong SL (2002) Engineering of a *Bacillus subtilis* strain with adjustable levels of intracellular biotin for secretory production of functional streptavidin. *Appl Environ Microbiol* **68**(3): 1102-1108

Wu SC, Yeung JC, Duan Y, Ye R, Szarka SJ, Habibi HR, Wong SL (2002) Functional production and characterization of a fibrin-specific single-chain antibody fragment from *Bacillus subtilis*: effects of molecular chaperones and a wall-bound protease on antibody fragment production. *Appl Environ Microbiol* **68**(7): 3261-3269

Wu XC, Lee W, Tran L, Wong SL (1991) Engineering a *Bacillus subtilis* expression-secretion system with a strain deficient in six extracellular proteases. *J Bacteriol* **173**(16): 4952-4958

Ye R, Kim JH, Kim BG, Szarka S, Sihota E, Wong SL (1999) High-level secretory production of intact, biologically active staphylokinase from *Bacillus subtilis*. *Biotechnol Bioeng* **62**(1): 87-96

Zheng G, Yan LZ, Vederas JC, Zuber P (1999) Genes of the sbo-alb locus of *Bacillus subtilis* are required for production of the antilisterial bacteriocin subtilosin. *J Bacteriol* **181**(23): 7346-7355

Anexo 1

Medios y soluciones

Tabla A1. Medio LB.

Reactivos	Cantidad
Bacto triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g

Disolver en 1 L de agua destilada y ajustar el pH a 7.0 con NaOH, esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Para medio LB solido, adicionar 15 g de agar bacteriológico.

Medios para transformación de *B. subtilis*

Tabla A2. Medio A base 10x.

Reactivos	Cantidad
Extracto de levadura	10 g
Casaminoácidos	2 g
Glucosa 50%	100 mL

Disolver el extracto de levadura y los casaminoácidos en agua destilada hasta un volumen de 900 mL y esterilizar en autoclave, después agregar la glucosa al 50% previamente esterilizada por filtración.

Tabla A3. *Bacillus* Sales 10x.

Reactivos	Cantidad
(NH ₄) ₂ SO ₄	20 g
K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	183 g
KH ₂ PO ₄	60 g
citrato de Na	10 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	2 g

Disolver las sales hasta un volumen de 1 L y esterilizar en autoclave.

Tabla A4. Medio A.

Reactivos	Cantidad
Agua estéril	81 mL
Medio A base 10x	10 mL
Sales <i>Bacillus</i> 10x	9 mL

Tabla A5. Medio B.

Reactivos	Cantidad
Medio A	81 mL
CaCl ₂ .2H ₂ O 50 mM	0.1 mL
MgCl ₂ .6H ₂ O 250 mM	0.1 mL

Purificación de ADN plasmídico por lisis alcalina

Tabla A6. Solución I para purificar ADN plasmídico.

Reactivos	Cantidad
Tris-HCl (pH 8)	25 mM
EDTA	10 mM
Glucosa	10 mM

Tabla A7. Solución II para purificar ADN plasmídico.

Reactivos	Cantidad
SDS	1 %
NaOH	0.2 M

Tabla A8. Solución III para purificar ADN plasmídico.

Reactivos	Cantidad
Acetato de Sodio	3 M

Ajustar el pH a 4.8 con ácido acético glacial

Electroforesis en gel de agarosa

Tabla A9. TAE 50X.

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

Aforar a 1 L con agua miliQ.

Tabla A10. Gel de agarosa al 1%.

Reactivos	Cantidad
Agarosa	1 g
TAE 1X	100 mL
Bromuro de etidio (10 mg mL ⁻¹)	0.5 µg mL ⁻¹

Calentar la solución a máxima potencia durante 2 minutos.

Geles de acrilamida de gradiente.

Tabla A11. Soluciones requeridas.

Solución
Acrilamida (BioRad)
Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8
Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8
Dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10% (p/v)
Persulfato de amonio al 10% (APS)
Glicerol al 50% (v/v)
Azul de bromofenol al 1% (p/v)

Filtrar la solución de azul de bromofenol, para remover agregados del colorante.

Tabla A12. Soluciones para el gel de gradiente.

Soluciones	Gel al 4%	Gel al 20%
Acrilamida (BioRad)	365 µL	1815 µL
Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8	690 µL	690 µL
SDS al 10%	27.5 µL	27.5 µL
H ₂ O MQE	1650 µL	205 µL
TEMED	1.83 µL	0.91 µL
APS al 10%	9.16 µL	9.16 µL

Tabla A13. Soluciones para el gel concentrador.

Soluciones	Gel al 4%
Acrilamida (BioRad)	365 µL
Tris-HCl 1.5 M, pH 6.8	690 µL
SDS al 10%	27.5 µL
H ₂ O MQE	1650 µL
TEMED	1.83 µL
APS al 10%	9.16 µL

NOTA: Adicionar el TEMED y el APS antes de usar.

Tabla A14. Soluciones para el gel de gradiente.

Soluciones	Cantidad
Tris-HCl 1 M, pH 6.8	0.6 mL
Glicerol al 50%	5 mL
SDS al 10%	2 mL
2-b-mercaptoetanol	0.5 mL
Azul de bromofenol al 1%	1 mL

Tabla A15. Amortiguador de corrida.

Reactivos	Cantidad
Tris-base	3 g
Glicerol	14.4 g
SDS	1 g

Disolver en 1 L de agua destilada, el pH aproximado es de 8.3.

Western blot

Tabla A16. Amortiguador de transferencia *Towbin*.

Reactivos	Cantidad
Tris-base	25 mM
Glicina	192 mM

Disolver en solución de metanol al 20%.

Tabla A17. Amortiguador de fosfatos (PBS).

Reactivos	Cantidad
NaCl	140 mM
Na ₂ HPO ₄	7.2 mM
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	2.8 mM

Disolver en agua miliQ, ajustar el pH a 7.5.

Tabla A18. Solución para bloquear.

Reactivos	Cantidad
Leche descremada svelty®	3 g

Disolver en 100 mL de PBS.

Tabla A19. Amortiguador para la enzima fosfatasa alcalina.

Reactivos	Cantidad
Tris HCl (pH 9.5)	0.1 M
NaCl	0.1 M
MgCl ₂ .6H ₂ O	50 mM

Tabla A20. Solución de anticuerpos policlonales primarios.

Anticuerpo	Concentración
Anti rhIFN- γ	0.2 $\mu\text{g mL}^{-1}$
Anti rhIL-2	0.2 $\mu\text{g mL}^{-1}$

Diluir en PBS con 1% de BSA.

Tabla A21. Solución de anticuerpos policlonales secundarios.

Anticuerpo	Dilución
cabra anti- IgG de conejo acoplado a AP	1.3000

Diluir en PBS con 1% de BSA.

Tabla A22. Mezcla de reacción para la PCR

Volumen	Reactivo
38.5 μL	Agua miliQ
5.0 μL	Amortiguador de PCR 10X Mezcla de dNTP (10mM)
1.0 μL	Oligonucleótido I (10pmol/ μL)
1.0 μL	Oligonucleótido II (10pmol/ μL)
1.0 μL	<i>Taq</i> ADN Polimerasa
0.5 μL	MgCl ₂ (50mM)
2.0 μL	ADN molde (12ng/ μL)
1.0 μL	

Tabla A23. Programa usado para la amplificación de los fragmentos sp-*amyL*, hIL-2, hIFN- γ , P43

Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo
1	94	5 min
30	94	30 s
30	55	30 s
30	72	1 min
1	72	7 min
1	4	∞

Anexo 2

Métodos estándar

Preparación de células competentes de *E. coli*

Se siembra por estría la cepa de *E. coli* de interés en una placa con medio LB sólido y se incuba durante toda la noche. Se prepara un preinóculo en 10 mL de medio LB líquido con una colonia de *E. coli* aislada y se incuba durante toda la noche en un agitador orbital a 250 rpm y 37°C. Se toma el volumen necesario del preinóculo para ajustar el cultivo a una OD600 de 0.1 en 30 mL de medio LB líquido fresco contenido en un matraz de 250 mL, se incuba a 37°C y 250 rpm en el incubador orbital y se sigue una cinética de crecimiento hasta que el cultivo alcance una OD600 de 0.5. Se vacía el volumen total del cultivo en un tubo de 50 mL para centrifuga previamente enfriado (4°C) y se incuba en hielo durante 15 min. El tubo conteniendo el cultivo celular se centrifuga a 4,000 rpm durante 5 min (la centrifuga debió enfriarse previamente). Se desecha el sobrenadante cuidadosamente por decantación y la pastilla celular se resuspende suavemente en 15 mL de una solución fría de CaCl₂ 100 mM, la suspensión celular se incuba nuevamente en hielo durante 15 min. Se decanta el sobrenadante cuidadosamente para no perder la pastilla celular, por último, la pastilla celular se resuspende en 2 mL de la solución fría de CaCl₂. Las células son competentes en este punto y pueden ser transformadas. Las células conservan su estado de competencia durante 1 mes (aproximadamente) almacenándolas a -70°C en alícuotas de 100 µL con un volumen igual de glicerol al 50% estéril.

Preparación de células competentes de *Bacillus subtilis* y transformación.

Para llevar las células de *B. subtilis* al estado natural de competencia se inoculan 2-3 colonias frescas en un tubo con 20 mL de medio A y se incuba toda la noche a temperatura ambiente sin agitación. Al día siguiente el cultivo se transfiere a un matraz de 250 mL, se incuba a 37°C y 250 rpm. Se toman alícuotas de 1 mL para seguir la cinética de crecimiento a una OD600. Se registran los valores en papel semi-logaritmico hasta localizar el t₀. Que es el punto de intersección entre la línea de crecimiento exponencial (log) y el inicio de la fase estacionaria. Esto toma entre 60 y 90 min de incubación. Se continúa la incubación durante 90 min después de haber cesado la fase log de crecimiento (t₉₀). En este punto se diluyen 50 µL del cultivo en 450 µL de medio B en un tubo de vidrio estéril de 16 x 125 mm. Los tubos se incuban con agitación vigorosa (250

rpm) durante 90 min más, en este punto las células son altamente competentes para su transformación con DNA plasmídico circular, lineal y cromosómico (según se requiera). Para transformar *B. subtilis* se agregan a los 500 μ L de células competentes 1 μ g de DNA transformante y se incuban los tubos durante 30 min a 37°C. La mezcla de transformación se siembra en alícuotas de 200 μ L sobre placas con medio LB sólido conteniendo el antibiótico adecuado.

Transformación de *E. coli*

A un tubo con 100 μ L de células competentes de *E. coli* se le agregan 1 μ L de plásmido circular o el volumen total de una reacción de ligación, se incuba la mezcla en hielo durante 30 min para que el DNA se precipite sobre la célula, posteriormente se le da un choque térmico incubando el tubo en un baño de agua a 42°C durante 2 min, inmediatamente después se incuban las células durante 1 min en hielo, se adicionan 250 μ L de medio LB a la suspensión celular y se incuba a 37°C y 250 rpm durante 1.5 h, finalmente las células transformantes se seleccionan sembrando alícuotas en placas de medio LB sólido con el antibiótico de resistencia del plásmido (las placas se incuban a 37°C durante toda la noche).

Obtención de DNA plasmídico

Un tubo de 50 mL con 5-10 mL de medio LB líquido suplementado con el antibiótico adecuado se inocula con una colonia aislada de *E. coli* transformante e incuba a 37°C durante toda la noche, posteriormente las células se cosechan centrifugando 1 mL del cultivo a 13,000 rpm durante 2 min, el pellet se resuspende en 100 μ L de la solución I; a la suspensión celular se le adicionan 200 μ L de la solución II, se invierte el tubo suavemente 3 a 6 veces y se incuba en hielo durante 5 min, después se le adicionan al lisado celular 150 μ L de solución III, se centrifuga el tubo a 13,000 rpm durante 10 min. El sobrenadante se transfiere a un tubo limpio y se extrae con 400 μ L de una solución fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), la solución se mezcla en el vortex durante 5 seg, y posteriormente se centrifuga a 14,000 rpm durante 10 min y se recolecta la fase superior acuosa en un tubo limpio, se precipita el DNA plasmídico con etanol absoluto frío y se lava 3 veces con etanol al 70%, finalmente se seca la pastilla al aire y se resuspende en 30 μ L de agua libre de nucleasas.



Replicative and integrative plasmids for production of human interferon gamma in *Bacillus subtilis*

Juan A. Rojas Contreras^a, Mario Pedraza-Reyes^b, Leandro G. Ordoñez^a, Norma Urtiz Estrada^c, Ana P. Barba de la Rosa^a, Antonio De León-Rodríguez^{a,*}

^a División de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, Camino a la Presa San José 2055, Lomas 4^a, Sección, C. P. 78216, San Luis Potosí, SLP, Mexico

^b Depto. de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Guanajuato, AP 187, Noria Alta S/N, Guanajuato, 36050 Guanajuato, Gto, Mexico

^c Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Juárez del Estado de Durango, Av. Veterinaria S/N, Col. Valle del Sur, Circuito Universitario, C.P. 34120 Durango, Dgo, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 April 2010

Accepted 5 July 2010

Available online 17 July 2010

Communicated by J. Casadesus

Keywords:

Heterologous

Integrative

Probiotic

Therapeutic

Recombinant

Replicative plasmid and secretion

ABSTRACT

Integrative and replicative plasmids for the expression driven by the P₄₃ promoter and secretion of recombinant proteins in *Bacillus subtilis* were constructed. The plasmids named plnt and pRep respectively were tested for the production of recombinant human interferon gamma (rhIFN- γ). A synthetic hIFN- γ gene employing the optimized *B. subtilis* codon usage was fused with the *Bacillus licheniformis* α -amylase signal peptide (*sp-amyl*) encoding sequence. The integrative construct produced $2.5 \pm 0.2 \text{ mg l}^{-1}$ and the replicative system produced $20.3 \pm 0.8 \text{ mg l}^{-1}$ of total recombinant rhIFN- γ . The results showed that secretion of hIFN- γ was the bottleneck for the overexpression of mature rhIFN- γ by *B. subtilis*.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

A large collection of cloning and expression plasmids is available for the Gram-negative bacterium *Escherichia coli*. Therefore, most protein expression strategies in biotechnology research focus on this microorganism. However, aside from the advantages of *E. coli* systems, several problems can occur during the process of heterologous gene expression and purification, such as formation of inclusion bodies, protein misfolding, and toxicity problems.

Bacillus subtilis is a generally recognized as safe (GRAS) organism and considered as an alternative expression host for production of heterologous proteins. This Gram-positive bacterium does not produce endotoxins and directly secrete proteins to the culture medium simplifying the

purification of recombinant proteins (Simonen and Palva, 1993). Several vectors have been assessed for the production of microbial proteins in *B. subtilis* (see as recent publications: Özdamar et al. 2009; Lin et al., 2009; Liu et al., 2010). They are based on replicative plasmids, that have the risk of the segregational instability, which is one of the main problems using *B. subtilis* as expression system (Fleming and Patching, 1994). To our knowledge the choice of available integrative expression plasmids is still limited (Wang et al., 2004). In addition, few studies on the production of human cytokines in *B. subtilis* have been reported and the overexpression is still a challenge (Lam et al., 1998; Min-Young et al., 2002; Westers et al. 2006; Westers et al., 2004).

Human interferon gamma (hIFN- γ) is an immunomodulatory cytokine involved in a broad range of biological activities. The hIFN- γ is a glycoprotein of 143 amino acid residues with a molecular mass of 20–25 kDa produced

* Corresponding author. Fax: +52 444 8342010.

E-mail address: aleonr@ipicyt.edu.mx (A. De León-Rodríguez).

Capítulo II.

Caracterización enzimática y
modelamiento molecular de una
superóxido dismutasa de *Deschampsia
antarctica* E. Desv, producida en *E. coli*.

Resumen

“Caracterización enzimática y modelamiento molecular de una superóxido dismutasa de *Deschampsia antarctica* E. Desv, producida en *E. coli*.”

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son moléculas producidas durante el metabolismo de los organismos aeróbicos y son exacerbadas bajo condiciones de estrés como la exposición al frío, radiación ultravioleta, desecación etc. Estas moléculas reactivas provocan la oxidación de lípidos, inactivación de enzimas o rupturas de la cadena del DNA, lo que conlleva al envejecimiento celular y desarrollo de enfermedades. Las superóxido dismutasas (SODs) constituyen la primera línea de defensa contra las ROS y se clasifican de acuerdo al cofactor metálico presente en su sitio activo en: SODs dependientes de Mn, Fe, Ni y Cu-Zn. *Deschampsia antarctica* E. Desv. es una de las dos plantas vasculares nativas que viven en la Antártica, por lo que debido a las condiciones extremas de su hábitat, es muy probable que esta especie haya tenido que adaptarse mediante la evolución de sus sistema de defensa antioxidantes. Por ello, en este estudio se realizó la caracterización bioquímica y el modelamiento de una superóxido dismutasa de *Deschampsia antarctica* E. Desv, producida en *Escherichia coli*. La proteína recombinante producida en *E. coli* se purificó mediante cromatografía de afinidad en una columna de Ni-NTA-agarosa y se demostró su identidad mediante ensayos de fotorreducción del NBT e inhibición en solución por H₂O₂ y KCN. Adicionalmente, el análisis mediante espectroscopía de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES) confirmó la presencia en la proteína de Cu y Zn. Los ensayos de actividad por el método de NBT en solución descrito por McCord y Fridovich demostraron que la Cu-Zn SOD de *D. antarctica* (DaSOD) tiene una actividad específica de 5, 818 U/mg a 25°C y pH 7.2. Además, se demostró que la DaSOD a pesar de ser una enzima que presenta actividad a temperaturas bajas (0°C y -20°C), tiene una gran termoestabilidad.

Caracterización enzimática y modelamiento molecular de una superóxido dismutasa de *Deschampsia antarctica* E. Desv, producida en *E. coli*. *Palabras clave:* Especies de oxígeno reactivas (ROS), Antioxidantes, Extremófilos.

Abstract

“Enzymatic characterization and molecular modeling of a *Deschampsia antarctica* E. Dev superoxide dismutase, produced in *E. coli*”

Reactive oxygen species (ROS) are molecules produced during the metabolism of aerobic organisms and are exacerbated under conditions of stress such as exposure to cold, ultraviolet radiation, desiccation, etc. These reactive molecules may cause lipid peroxidation, inactivation of enzymes and DNA modification, leading to cell aging and disease development. The superoxide dismutases (SODs) are the first line of defense against ROS and are classified according to metal cofactor present in its active site (Mn, Fe, Ni and Cu-Zn). *Deschampsia antarctica* E. Dev. is one of the two native vascular plants that live in Antarctica, so that due to the extreme conditions of their habitat, it is clear that the specie had to evolve its antioxidant defense system to tolerate and survive. In this study, we performed a biochemical characterization and modeling of a superoxide dismutase isolated from *Deschampsia antarctica* E. Dev and produced in *Escherichia coli*. The recombinant protein produced in *E. coli* was purified by affinity chromatography Ni-NTA and their identity was demonstrated by NBT photoreduction assays and inhibition by H₂O₂ and KCN. Additionally, analysis by ICP-OES confirmed the presence of Cu and Zn. Activity assays by the NBT solution method described by McCord and Fridovich showed that the *D. antarctica* Cu-Zn SOD (DaSOD) has a specific activity of 5,818 U/mg at 25°C and pH 7.2. Furthermore, it was shown that despite being DaSOD an enzyme which has activity at low temperatures (0°C and -20°C), has a high thermostability.

Enzymatic characterization and molecular modeling of a *Deschampsia antarctica* E. Dev superoxide dismutase, produced in *E. coli*. KEY WORDS: ROS, Antioxidant, Extremophiles.

1. Introducción

Los organismos terrestres Antárticos viven permanentemente en el continente y sobreviven en uno de los entornos más hostiles de la Tierra. Los sitios que sostienen la vida en la Antártida están limitados en gran medida a las regiones que están libres de hielo, por lo menos durante parte del año y que reciben agua proveniente del deshielo en primavera y verano. Viviendo en tales condiciones, estos organismos pueden ser indicadores particularmente sensibles al cambio climático y son buenos modelos para el estudio de cómo la vida se desarrolla en ambientes extremos (Wharton & Marshall, 2009).

El agotamiento del ozono estratosférico en el final de la primavera austral y principios del verano aumenta significativamente la radiación UV-B (280–315 nm) que alcanza los hábitats antárticos terrestres (hasta en un 50%), así como también aumenta la penetración de radiaciones con longitudes de onda mayores como la luz UV-A (315-400 nm) a través de la atmósfera. Los aumentos antropogénicos y naturales de la radiación UV-B, junto con el aumento de la luz UV-A, pueden influir negativamente en el crecimiento de los organismos (Hughes et al, 2003).

Deschampsia antarctica E. Desv. una de las dos plantas nativas que habitan en la Antártida parece estar bien adaptada a los constantes cambios en las condiciones de crecimiento y diversos factores abióticos, tales como: la alta y baja radiación durante el verano y el invierno respectivamente, una precipitación deficiente, sequías, inundaciones, salinidad, temperaturas variables, heladas, nieve, hielo, etc. (Gielwanowska et al, 2005). Se ha demostrado que gran parte de estos factores aumentan la cantidad de especies reactivas de oxígeno (ERO) presentes en la célula, está claro que la planta ha tenido que evolucionar su sistema de defensa antioxidante para tolerarlos y sobrevivir. De hecho, se han reportado altos niveles de actividad de superóxido dismutasas, peroxidasas y glutatión reductasas en extractos de esta planta (Pérez-Torres et al, 2004).

Es por ello, que además de servir como modelo en el estudio del desarrollo de la vida en condiciones extremas, también hay un creciente interés en la búsqueda en *D. antarctica* de moléculas con aplicaciones prácticas en la industria cosmética, médica, industrial y alimentaria.

2. Marco teórico

2.1. Radicales libres y especies reactivas de oxígeno

Los radicales libres pueden ser definidos como especies químicas, moléculas o átomos, capaces de existir independientemente con uno o más electrones desapareados en su última capa u orbital electrónico, es decir, con un número impar de electrones (Cheeseman & Slater, 1993; Halliwell et al, 1992). Pueden estar cargados positivamente, negativamente o ser eléctricamente neutros.

La existencia del electrón desapareado, es lo que les confiere su alta reactividad con una gran cantidad de moléculas biológicas (lípidos, proteínas, ácidos nucleicos, etc.), ya que tiende rápidamente a ganar o ceder un electrón para conseguir así una conformación estable, esto hace que su vida media sea muy corta.

En los sistemas biológicos, los radicales libres se forman continuamente, algunos ejemplos de estos son el radical superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$) y el radical hidroxilo ($\text{HO}\bullet$), radicales centrados en el oxígeno, el radical triilo ($\text{RS}\bullet$) que es un radical centrado en el azufre, el triclorometilo ($\text{CCl}_3\bullet$), radical centrado en el carbono y formado por el metabolismo del CCl_4 en el hígado, etc. (Halliwell et al, 1992).

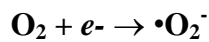
Siempre que un radical cede o toma un electrón, o simplemente se une a una molécula no radical ésta se transforma en radical (Ballester, 1996; Halliwell, 1989). Normalmente se producen reacciones en cadena así un radical produce otro y éste otro, etc. Sólo cuando dos radicales se unen desaparecen como tales (Ballester, 1996; Halliwell et al, 1992).

En los organismos vivos, los oxidantes y radicales libres más abundantes y reactivos son los derivados del oxígeno. Dichos radicales se agrupan dentro del término genérico de “especies reactivas del oxígeno” (ERO), haciéndose referencia con este término, a un conjunto de moléculas que incluyen no sólo a los radicales de oxígeno propiamente dichos, entre los que se encuentran el $\bullet\text{O}_2^-$ y el $\bullet\text{HO}$, sino también a algunas moléculas, no radicales, derivadas del oxígeno e

involucradas directamente en la producción de radicales del oxígeno, como pueden ser el peróxido de hidrógeno (H₂O₂), el oxígeno singulete (¹O₂) y el ácido hipocloroso (HClO) (Ballester, 1996). Como consecuencia de la formación continua de radicales libres, debe existir en el organismo un adecuado sistema no sólo de defensa antioxidante sino también de reparación del daño oxidativo producido (Fridovich, 1989).

2.1.1. Radical superóxido

El radical superóxido es un radical libre cargado, formado como consecuencia de una reducción monovalente o monoeléctrica del oxígeno molecular.



Es una especie menos reactiva que otros radicales como puede ser el HO• y aunque se ha observado su participación en procesos citotóxicos (Fridovich, 1976; McCord & Fridovich, 1969), no parece ser un agente citotóxico que actúe directamente, sino que su principal efecto es el de actuar como fuente de H₂O₂ u otros radicales libres y como reductor de iones metálicos de transición (Cheeseman & Slater, 1993).

La principal fuente de producción del anión superóxido se encuentra en la cadena de transporte mitocondrial, ya que de un 5 a un 10% del oxígeno consumido es prácticamente reducido por electrones provenientes de los transportadores de dicha cadena (Boveris & Chance, 1973). Así, la ubisemiquinona parece ser la responsable de cerca del 75% de superóxido formado por esta vía (Boveris & Cadenas, 1975) y la NADH deshidrogenasa la productora del resto (Turrens & Boveris, 1980).

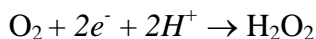
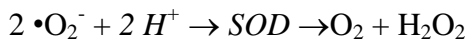
Entre otras fuentes nos encontramos, el escape de electrones del citocromo P₄₅₀ en el retículo endoplasmático hepático, la autooxidación de moléculas como hemoproteínas, hidroquinonas, catecolaminas, ascorbato, tioles, etc., o como productos durante los procesos de fagocitosis en la respuesta inflamatoria, o

reacciones como las catalizadas por xantina oxidasa y aldehído oxidasa (Ballester, 1996).

Entre sus efectos fisiológicos, se ha descrito su capacidad vasoconstrictora en células del músculo liso (Laurindo et al, 1991). A pH bajo el anión superóxido podría protonarse, transformándose en el radical perhidroxilo (HO_2^\cdot), siendo esta forma protonada más reactiva y capaz de generar lipoperoxidación *in vitro*, al poder reaccionar directamente con ácidos grasos poliinsaturados libres, aunque *in vivo* se ha demostrado que su tendencia es reaccionar con lipoperoxidos ya formados dando lugar a radicales peroxilo (Bielski et al, 1983). Sin embargo, a pH fisiológico menos del 1% del superóxido se encuentra en su forma protonada (Cheeseman & Slater, 1993).

2.1.2. Peróxido de hidrógeno

El peróxido de hidrógeno es un metabolito del oxígeno intracelular, formado por una dismutación del anión superóxido (catalizada por la superóxido dismutasa (SOD), o directamente a través de la reducción bivalente de oxígeno.



El H_2O_2 al igual que el anión superóxido presenta una reactividad química limitada, pero su capacidad para atravesar membranas y el hecho de poder generar en presencia de iones metálicos de transición o del $\cdot\text{O}_2^-$, el radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), hace que se incluya dentro del término genérico de “ERO”, a pesar de no ser en sí un radical libre ya que no presenta electrones desapareados.

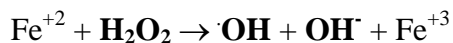
En mitocondrias, en condiciones fisiológicas se ha estimado una producción de 0.3 a 0.6 μmol de $\text{H}_2\text{O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$ de proteína, pudiéndose incrementar dicha producción con un aumento de PO_2 en el medio, lo que implica al H_2O_2 en el efecto letal inducido por altas presiones de este gas (Chance et al, 1979).

Se ha observado que pequeñas concentraciones de H₂O₂ producen lisis eritrocitaria, asimismo pueden producir la oxidación directa de compuestos sulfhídricos, tales como residuos de metionina de diversas proteínas e inducir indirectamente la peroxidación de los ácidos grasos de las membranas celulares (Halliwell & Gutteridge, 1984). Se ha demostrado la inducción de la producción del factor activador plaquetario por el endotelio en presencia de H₂O₂ (Redl et al, 1993).

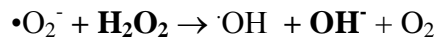
El H₂O₂ tiene la capacidad de atravesar las membranas biológicas, pudiendo causar o promover el daño oxidativo en macromoléculas distantes de su lugar de producción (Chance et al, 1979).

2.1.3. Radical hidroxilo

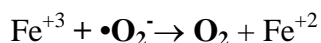
El radical hidroxilo es el radical más reactivo entre las especies oxigenadas conocidas capaz de reaccionar de modo directo con prácticamente cualquier molécula biológica. En su producción radica, en la mayoría de los casos la citotoxicidad de los radicales •O₂⁻ y H₂O₂, ya que, como se ha comentado, estas moléculas presentan una baja reactividad. En los organismos vivos, la principal fuente de producción del radical hidroxilo, parece ser la descomposición del peróxido de hidrógeno en presencia de metales de transición, principalmente el hierro y cobre. Siendo en el caso del hierro a través de la denominada reacción de Fenton (Aruoma et al, 1991; Halliwell & Gutteridge, 1986; Minotti & Aust, 1987).



La producción de hidroxilo puede estimularse por el anión superóxido, mediante la denominada reacción de Haber-Weiss o también denominada en algunos casos reacción de Fenton conducida por el •O₂⁻ (Halliwell & Gutteridge, 1986; Halliwell et al, 1992).



La reacción de Haber-Weiss, se podría entender como el resultado de la unión o colaboración de la reacción de Fenton con la capacidad del anión superóxido para reducir metales iónicos de transición.



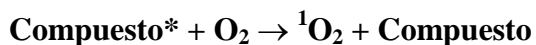
Hay otras vías de producción de radical hidroxilo en organismos vivos, entre los que se encuentran la fisión homolítica del agua provocada por excesiva exposición a radiaciones ionizantes (Armstrong, 1958) o bien la descomposición de peroxinitrilo, independiente de metales iónicos de transición (Beckman et al, 1990). En esta última vía también interviene el anión superóxido, ya que es el causante de la formación de radical peroxinitrilo al reaccionar con el óxido nítrico (NO), especialmente en fagocitosis y células endoteliales vasculares (Saran & Bors, 1990).

2.1.4. Oxígeno singulete

El oxígeno singulete no es un radical en sí, pero junto al radical hidroxilo, es considerada como una de las especies oxigénicas capaces de reaccionar directamente con macromoléculas como pueden ser ácidos grasos (Halliwell & Chirico, 1993; Sevanian & Hochstein, 1985).

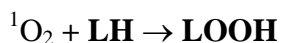
Es producido por absorción de energía por una molécula de oxígeno, lo que causa una nueva disposición de los electrones como consecuencia del cambio de orientación de uno de sus espines. La vía más importante de producción en sistemas biológicos se da cuando ciertos compuestos son iluminados en presencia de oxígeno, estos compuestos absorben la luz, adquiriendo un estado de alta excitación electrónica, y transfiriendo ese exceso de energía al oxígeno con lo que se convierte en oxígeno singulete (Halliwell & Chirico, 1993).





Entre estos agentes fotosensibles nos encontramos colorantes (p.ej. eosina), cierto tipo de drogas (p. ej. tetraciclinas) y una serie de sustancias encontradas en el cuerpo humano, como pueden ser porfirinas, riboflavininas y bilirrubina (Halliwell & Chirico, 1993). Por ejemplo en pacientes con cierto tipo de porfiria, se produce acumulación de porfirinas que puede provocar daños en la piel, al interactuar la luz solar con ellas dando lugar a la formación de oxígeno singulete (Krinsky, 1992).

A pesar de la capacidad del oxígeno singulete para reaccionar con ácidos grasos, no se puede considerar como un inductor de la peroxidación lipídica, como puede serlo el OH^\bullet , puesto que reacciona directamente con el ácido graso para dar peróxidos, sin que exista sustracción de hidrógeno, no dándose por lo tanto las reacciones en cadena (Frankel, 1984; Halliwell & Chirico, 1993).



La reacción de peróxidos entre sí, pueden producir oxígeno singulete, siendo esta otra vía de producción, aunque menor, puesto que la probabilidad de colisión entre estos peróxidos es baja.

Otra vía de producción es la observada por Kanofsky (Kanofsky & Sima, 1991), en la que la interacción del ozono con ciertas moléculas biológicas produce oxígeno singulete.

Estudios bioquímicos y fisiológicos en varios organismos, han demostrado que las SODs son la primera línea de defensa contra las especies reactivas de oxígeno y también uno de los principales componentes del sistema de defensa antioxidante (Krinsky, 1992).

El $\bullet\text{O}_2^-$ es producido en cualquier locación donde la cadena de transporte de electrones este presente, y por lo tanto, la activación del O_2 puede ocurrir en diferentes compartimentos de la célula (Forsmark et al, 1991), incluyendo mitocondrias, cloroplastos, microsomas, glioxisomas, peroxisomas, apoplastos, y

el citosol. Por lo tanto, no es sorprendente que las SOD estén presentes en todas estas localizaciones sub-celulares (Figura 1). Si bien todos los compartimientos de la célula son sitios posibles para la formación de $\bullet\text{O}_2^-$, se cree que los cloroplastos, las mitocondrias y los peroxisomas son los más importantes generadores de ROS (Fridovich, 1986). Se ha demostrado que las membranas de fosfolípidos son impermeables a las moléculas cargadas de $\bullet\text{O}_2^-$ (Takahashi & Asada, 1983), por lo tanto, es crucial que las SOD estén presentes para la eliminación de $\bullet\text{O}_2^-$ en los compartimientos en donde los radicales se forman (Takahashi & Asada, 1983).

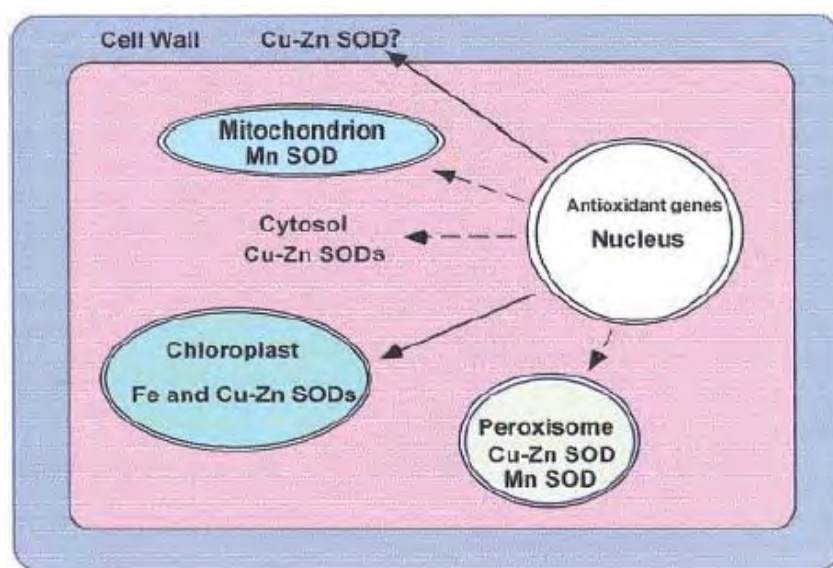


Fig. 1. Localización de las SODs dentro de la célula de la planta.

2.2. Clasificación de las SOD

Con base al co-factor metálico utilizado por la enzima, las SOD se clasifican en 4 grupos: las hierro SOD (FeSOD), las manganeso SOD (MnSOD), las SOD cobre-zinc (Cu-ZnSOD) y las níquel SOD (NiSOD) y estas se encuentran en diferentes compartimientos de la célula. Las FeSOD se encuentran en el cloroplasto, las Mn SOD en las mitocondrias y peroxisomas, y las Cu-ZnSOD en los cloroplastos, el citosol y en el espacio extracelular (Figura 1). La comparación de la secuencia predicha de aminoácidos de estos tres tipos diferentes de SOD sugieren que las

Mn y FeSOD son los tipos más antiguos y que estas enzimas probablemente han surgido de la misma enzima ancestral, mientras que las Cu-ZnSOD no tienen similitud de secuencia con las MnSOD y las FeSOD por lo que probablemente han evolucionado por separado (Kanematsu & Asada, 1991; Smith & Doolittle, 1992). La razón evolutiva para la separación de las SOD en base a su requisito por distintos metales está relacionada probablemente con los cambios en la disponibilidad de compuestos metálicos de transición presentes en la biosfera en relación al contenido de O₂ de la atmósfera durante las distintas eras geológicas (Bannister et al, 1991). Cada grupo de SODs serán descritas a continuación.

2.2.1. Hierro SODs (Fe SODs)

Las FeSODs constituyen, probablemente, el grupo más antiguo de SODs. Se ha sugerido que el hierro fue probablemente el primer metal utilizado como cofactor metálico en el sitio activo de la primera SOD debido a la gran cantidad de hierro soluble (Fe II) presente en aquel tiempo (Bannister et al, 1991). Como los niveles de O₂ en el entorno aumentaron, los componentes minerales del medio ambiente se oxidaron. La disminución de la disposición de Fe (II) en el medio ambiente provocó un cambio por el uso de un metal con mayor disponibilidad, Mn (III). Las FeSOD se encuentran tanto en procariotas y en eucariotas, son inactivadas por H₂O₂ y son resistentes a la inhibición por KCN. En todas las especies de plantas examinadas hasta la fecha, se infiere que se encuentran en los cloroplastos. Anticuerpos policlonales contra la FeSOD del lirio acuático (*Nuphar luteum*), la ubican dentro de los cloroplastos (Salin & Bridges, 1982). En *N. luteum* la Fe SOD también se localiza en el cloroplasto. La ausencia de FeSOD en animales ha dado lugar a la propuesta de que el gen que les dio origen, se originó en el plasto y se mudó al genoma nuclear durante la evolución. El apoyo a esta teoría proviene de la existencia de varias regiones conservadas en las secuencias de FeSOD que están presentes en plantas y cianobacterias, pero que están ausentes en las bacterias no fotosintéticas (Bowler et al, 1994). Hay dos grupos distintos de SOD Fe. El primer grupo es un homodímero formado por dos subunidades idénticas de 20 kDa, con 1-2 átomos de hierro en el centro

activo. Este tipo de FeSOD han sido aisladas de *Escherichia coli* (Yost & Fridovich, 1973); *Photobacterium sepoa* y *P. leiognathi* (Puget & Michelson, 1974), la bacteria púrpura sulfurosa *Chromatium vinosum* (Kanematsu & Asada, 1978), y las especies de plantas, *Ginkgo biloba*, *Brassica calpestris* y *Nuphar luteum* (Salin & Bridges, 1980). El segundo grupo de FeSOD, que se encuentra en la mayoría de las plantas superiores, es un tetrámero de cuatro subunidades iguales con un peso molecular de 80-90 kDa. Los miembros de este grupo contienen 2-4 átomos gramo de hierro en el centro activo.

2.2.2. Manganeso SODs (MnSODs)

Las MnSODs son probablemente las segundas más antiguas después de las Fe SODs y se cree que evolucionaron de una Fe SOD ancestral, tal vez, por ello de la existencia de SODs “cambialísticas”. Las MnSODs están presentes en mitocondrias y peroxisomas y poseen solo un átomo metálico por subunidad. Estas enzimas no son funcionales sin el átomo de Mn presente en el sitio activo. Aun cuando las Mn y FeSODs tienen una gran similitud en su estructura primaria, secundaria y terciaria, han divergido suficientemente, a tal grado que el Fe (II) no restaura la actividad de una MnSOD y vice versa (Fridovich, 1986). Las MnSODs llevan a cabo la catálisis mediante la atracción de las moléculas de $\bullet\text{O}_2^-$ negativamente cargadas hacia el sitio formado por los aminoácidos cargados positivamente presentes en el sitio activo de la enzima. El metal presente en el sitio activo dona enseguida un electrón directamente al $\bullet\text{O}_2^-$, reduciéndolo, el cual a su vez forma una molécula de H_2O_2 reaccionando con un protón (Bowler et al, 1994). Las MnSODs son enzimas tanto homodiméricas como homotetraméricas con un átomo de Mn (III) por subunidad. La enzima no es inhibida por cianuro de potasio (KCN) o inactivada por H_2O_2 y está presente tanto en eucariotes como en procariotes. Las MnSODs de plantas poseen aproximadamente un 65% de similitud en secuencia con cualquier otra, y estas enzimas también tienen una alta similitud a las MnSODs bacterianas (Bowler et al, 1994).

2.2.3. Cobre-zinc SODs (Cu-ZnSODs)

Cuando el oxígeno saturó la atmosfera por completo, el Fe (II) no estuvo disponible y el Cu (I) insoluble se convirtió en Cu (II) soluble, este comenzó a utilizarse como cofactor metálico en el sitio activo de las SODs. Debido a que las Fe y Mn SODs poseen propiedades eléctricas similares, la transición del uso de hierro al uso de manganeso requirió pequeñas modificaciones en la estructura proteica de la SOD, es por ello que, las Mn y FeSOD son estructuralmente muy similares. Sin embargo, las propiedades eléctricas de las Cu-ZnSODs difieren enormemente de las de Fe y MnSODs, por lo tanto se produjo un cambio importante en la estructura de la SOD después de que el Cu se convirtió en el cofactor metálico (Bannister et al, 1991). Las Fe y MnSODs están presentes tanto en organismos procariontas como eucariotas y aunque las Cu-ZnSODs se han encontrado principalmente en eucariotas, su presencia se ha reportado en algunas bacterias, incluyendo *Photobacterium leiognathi*, *Caulobacter crescentus*, y *pseudomonadales*.

Las siguientes hipótesis intentan explicar la presencia de las Cu-ZnSOD en procariontas:

- (1) Las Cu-ZnSODs evolucionaron independientemente en procariontas y eucariotas.
- (2) Las Cu-ZnSODs se originaron en eucariotas y el gen eucariótico fue transferido a los procariontas. Esta hipótesis fue propuesta por primera vez por Martin y Fridovich (Martin & Fridovich, 1981) y luego fue apoyada por Bannister y Parker en 1985 (Bannister & Parker, 1985) debido a la similitud del 30% entre la secuencia de aminoácidos de la Cu-ZnSOD del caballo de mar y su simbiote *Photobacterium leiognathi*. Después de tomar en cuenta algunas mutaciones puntuales, se logró

una similitud mayor al 44% apoyando aún más la hipótesis (Leunissen et al, 1986). Sin embargo, la presencia de Cu-ZnSOD en *Caulobacter crescentus* (Steinman, 1982) y en pseudomonadales que no son simbioses (Steinman, 1985) sugiere que dicha hipótesis requiere un mayor refinamiento.

- (3) Las Cu-ZnSOD se originaron primero en procariotas y luego fueron transferidas a los eucariotas. Sin embargo, esta hipótesis implica la existencia poco probable de una Cu-ZnSOD ancestral común entre eucariotas y procariotas que se originó antes de que ambos dominios se separaran, un hecho que tuvo lugar antes de que el Cu (II) estuviera disponible en la atmósfera.

2.3. Estructura de la Cu-Zn SOD

La Cu-ZnSOD se aisló por primera vez en 1939, a partir de eritrocitos bovinos (Keilin & Mann, 1940), aunque en este primer aislamiento no se le asoció ninguna actividad enzimática, siendo denominada hemocupremia por su contenido en cobre. Posteriormente McCord et al. (1969) mostraron su capacidad enzimática para inhibir la oxidación de ferrocitocromo C por eliminación de $\bullet\text{O}_2^-$, siendo renombrada a la hemocupremia como superóxido dismutasa (McCord & Fridovich, 1969). En 1982, la primera estructura tridimensional completa de una Cu-Zn SOD, producto del gen SOD1 de eritrocitos bovinos (*Bt*Cu-ZnSOD, PDB code 2SOD) (Tainer et al, 1982), permitió a los investigadores establecer las bases estructurales del mecanismo enzimático y estabilidad de las Cu-ZnSODs (Figura 2) (Tainer et al, 1983). Desde su estructura primaria hasta la cuaternaria, las Cu-ZnSODs eucarióticas son altamente conservadas, y están compuestas por dos subunidades idénticas (Figura 2). Cada subunidad consiste de un barril- β compuesto a su vez por ocho cadenas- β antiparalelas organizadas en un motivo tipo Greek key (llave griega) (Richardson, 1977). Los residuos hidrofóbicos estrechamente empaquetados del núcleo del barril, y los loops β 3/ β 4 y β 6/ β 7 forman las conexiones +3 cadena β /Greek key (GK1 y GK2) (Getzoff et al, 1989;

Tainer et al, 1982). Dos residuos conservados de Leu dentro de estos loops tipo Greek key rellenan los extremos del barril- β y son denominados residuos "corcho". Otros dos loops externos forman el canal del sitio activo. El primer loop $\beta 4/\beta 5$ sujeta la interfase del dímero con el sitio activo de zinc y contiene un enlace disulfuro que permite la estabilización (Getzoff et al, 1992; Getzoff et al, 1989; Getzoff et al, 1983; Hallewell et al, 1991; Tainer et al, 1982). El enlace disulfuro estabiliza tanto el plegamiento de la subunidad como la interfase del dímero. El segundo loop, $\beta 7/\beta 8$ o loop electrostático (EL) guía y acelera la entrada del substrato $\bullet O_2^-$ al sitio activo (Getzoff et al, 1992; Getzoff et al, 1983).

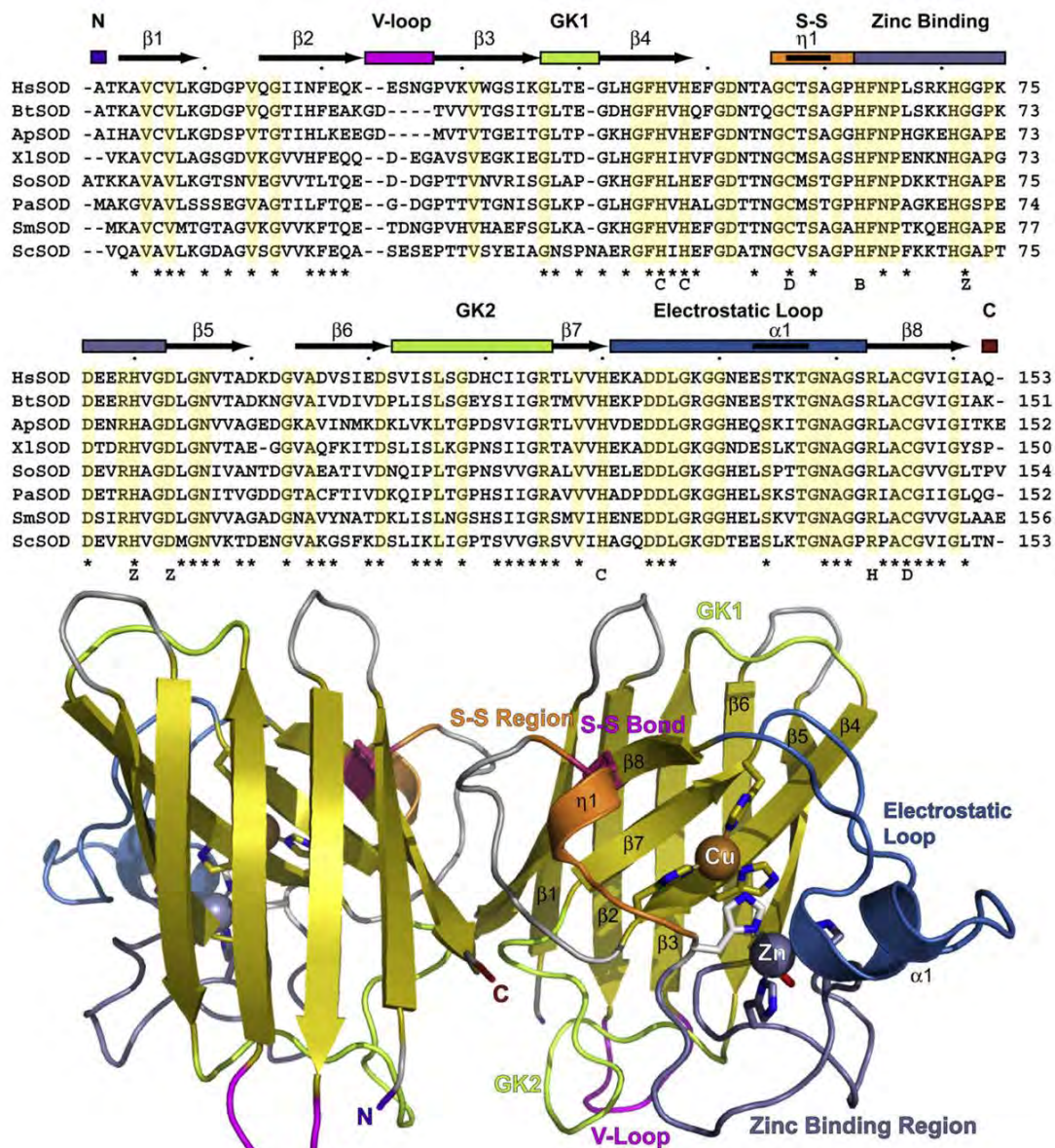


Fig. 2. Secuencia conservada, plegamiento, y regiones estructurales y funcionales de Cu-ZnSOD, eucarióticas (A) Alineamiento basado en la estructura de Cu-ZnSOD eucarióticas resueltas por cristalografía: HsSOD, *H. sapiens*; BtSOD, *B. taurus*; ApSOD, *A. pompejana*; XlSOD, *X. laevis*; SoSOD, *S. oleracea*; PaSOD, *P. atrosanguina*; SmSOD, *S. mansoni*; Sc, *S. cerevisiae*. Los elementos estructurales y la estructura secundaria de Cu-ZnSOD son anotadas encima del alineamiento. Las letras debajo del alineamiento: C, ligandos de unión de Cu; D, Cisteínas involucradas en el puente disulfuro; B, histidina puente; Z, ligandos de unión de Zn; H, ligando de H₂O₂ en ApSOD. (B) Ejemplo de la estructura tridimensional de las Cu,ZnSOD. Los elementos estructurales clave en (A) están marcados con un código de color con abreviaciones (V-loop, loop Variable; GK1 y GK2, loops Greek key 1 y 2; S-S, región del puente disulfuro). La N y la C representan el amino y el carboxilo terminal respectivamente. Los ligandos metálicos se muestran en la estructura, la histidina puente es mostrada en blanco.

Los iones de Cu y Zn están posicionados por fuera del barril- β en el canal del sitio activo. El ion Cu (II), está rodeado por cuatro restos de histidina con una configuración cuadrado plana distorsionada. Uno de los restos de histidina es un ligando puente, con uno de sus nitrógenos unido al cobre y otro al Zn (II) contiguo, que presenta una configuración tetraédrica. El zinc está unido también a dos restos adicionales de histidina y a un resto de ácido aspártico (Kitagawa & Katsube, 1988).

El cobre está relativamente expuesto al medio, mientras que el zinc está más enterrado en la estructura proteínica. Esto era de esperar puesto que si la transferencia directa de electrones entre el $\bullet\text{O}_2^-$ y el Cu^{+2} ha de tener lugar, este ha de ser accesible al medio (Fridovich, 1976) (Ver Figura 4) . La estructura del sitio activo se ha podido determinar por difracción de rayos X y se muestra esquematizado en la siguiente figura.

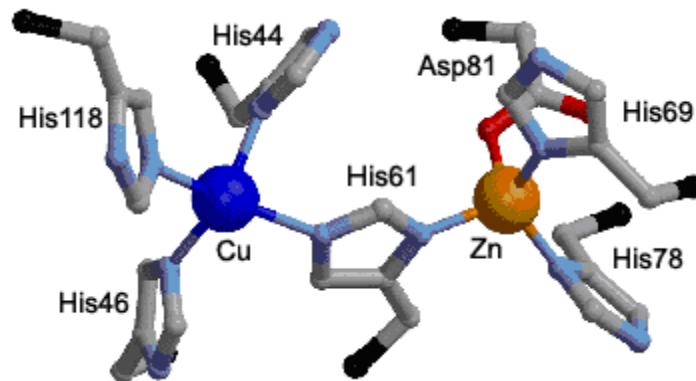


Fig. 3. Estructura esquematizada del sitio activo de las Cu-ZnSODs.

2.4. Mecanismo de acción de las Cu-ZnSODs

Las superóxido dismutasas protegen a las células de las especies reactivas de oxígeno catalizando la dismutación del radical superóxido en oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno. Como la diferencia entre el oxígeno molecular y el radical superóxido es un solo electrón, la enzima debe de tener una especificidad extrema además de que el sustrato debe ser distinguido de otras especies regulatorias diatómicas importantes que tienen básicamente el mismo tamaño como el óxido nítrico (Crane et al, 1997). En 1983 se propuso un mecanismo de acción basado en la estructura (Tainer et al, 1983), pero debido a las limitantes, los modos de unión del sustrato/intermediario/producto al sitio activo solamente fueron estimados. Estructuras de alta resolución recientes como la de *ApCu-ZnSOD*, sola o en complejo con H_2O_2 (Shin et al, 2009) (la primera estructura con producto unido), ayudó a proponer un mecanismo para la acción de las Cu-ZnSODs, que toma en cuenta restricciones estéricas en el sitio de unión Cu (I) y como estas restricciones están relacionadas con la posición del Cu en dos sitios (Figura 4). Seguido del reconocimiento electrostático (Getzoff et al, 1983) y dirección del sustrato hacia el sitio activo (Getzoff et al, 1992) por residuos cargados positivamente como la Lys136 (Fisher et al, 1997) y la Arg143 (Fisher et al, 1994) de la *HsCu-ZnSOD*, la primera media reacción comienza con la entrada y unión del sustrato $\bullet O_2^-$ al Cu(II). El Cu (II) entonces es reducido a Cu (I), y el $\bullet O_2^-$ es oxidado a oxígeno molecular O_2 . El puente de unión entre el ion Cu y la histidina (*HsCu-ZnSOD* His63) se rompe, dejando a la His63 N ϵ 1 protonada. En la segunda media reacción, un protón de la His63 N ϵ 1 y un electrón de Cu (I) son donados al $\bullet O_2^-$ después de lo cual el Cu (I) es oxidado a Cu (II), y el $\bullet O_2^-$ es reducido a peróxido de hidrógeno o HO_2^- (Shin et al, 2009), restaurándose enseguida la unión del Cu a la histidina puente (Tainer et al, 1983). De la estructura de la *ApCu-ZnSOD*, se ha propuesto que el ion Cu (I) positivamente cargado puede ser atraído al sustrato $\bullet O_2^-$ negativamente cargado (Shin et al, 2009).

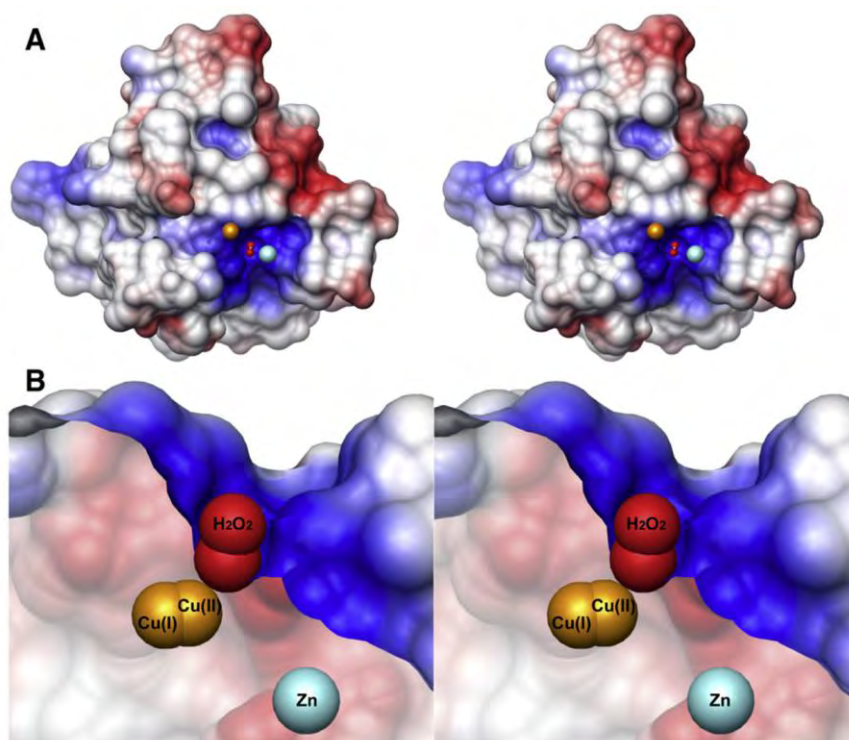
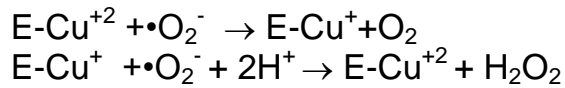


Fig. 4. (A) Potencial electrostático mapeado en la superficie de la estructura cristalina de ApSODH₂O₂ de *Alvinella pompejana*. El potencial electrostático (azul positivo), (rojo negativo), muestra la atracción electrostática del anión. La molécula de H₂O₂ (esferas rojas) ocupa la posición del sustrato/intermediario/producto de la reacción. Las esferas que representan el cobre (izquierda) y zinc (derecha) fueron adelantadas en la imagen para representar su posición relativa en la molécula. (B) Versión seccionada de la superficie. En esta vista, se distinguen claramente las restricciones estéricas sobre el sustrato/intermediario/producto. En los cristales se encontraron la forma oxidada y reducida del Cu (amarillo dorado) y en la figura se puede observar la distancia requerida para el movimiento del ion Cu durante la catálisis enzimática (Perry et al, 2010).

Las reacciones catalizadas por SOD por un mecanismo de oxidación-reducción cíclica del Cu (I) como cofactor metálico se resumen con las siguientes ecuaciones:



Tanto el Cu^{+2} como el Zn^{+2} pueden ser eliminados reversiblemente de la SOD. Sin embargo, la apoenzima es mucho más lábil que la holoenzima, y esta inestabilidad puede conducir en determinadas condiciones a una inactivación irreversible. Forman y Fridovich (Forman & Fridovich, 1973) estudiaron los efectos de los metales sobre la actividad de la SOD bovina y, posteriormente, Beem et al. (Beem et al, 1974) llevaron a cabo una investigación más detallada de la resolución reversible de esta enzima, utilizando la actividad enzimática, la movilidad electroforética y los espectros ópticos para estudiar el estado de la enzima. Estos últimos autores han demostrado que tanto el Cu^{+2} como el Zn^{+2} pueden ser eliminados reversiblemente, y que Co^{+2} , el Hg^{+2} o el Cd^{+2} pueden reemplazar al Zn^{+2} en su función de reforzamiento de la estabilidad enzimática, mientras que ningún metal puede reemplazar al cobre en su función catalítica. También se ha demostrado que el Cu^{+2} puede restaurar por si solo hasta un 80% de la actividad catalítica de la proteína nativa y que el sitio del zinc ha de estar ocupado para que tenga lugar la recuperación total de las propiedades nativas de la enzima.

2.5. Producción de proteínas recombinantes en *E. coli*.

La bacteria Gram-negativa *E. coli* es el microorganismo más utilizado para la producción de proteínas de interés comercial o terapéutico, debido a su genética bien caracterizada y la disponibilidad de un número cada vez más grande de vectores de expresión y cepas mutantes (Baneyx, 1999). El uso de *E. coli* además ofrece varias ventajas, como el uso de fuentes de carbono baratas, rápida acumulación de biomasa, facilidad para realizar fermentaciones a altas

densidades celulares así como simplicidad en el escalamiento de procesos (Baneyx & Mujacic, 2004). Sin embargo, la principal ventaja de *E. coli* radica en su capacidad de acumular proteínas exógenas que pueden representar más del 50% de su contenido de proteína total (Sorensen & Mortensen, 2005). A pesar de tener como desventaja la formación de cuerpos de inclusión, sigue siendo uno de los sistemas más utilizados en la industria farmacéutica para la expresión de biofármacos, porque existen métodos eficientes de solubilización con urea, guanidina-HCl y detergentes tales como SDS (Tsumoto et al, 2003).

2.5.1. *Escherichia coli* BL21-SI.

Existe un gran número de cepas de *E. coli* comercialmente disponibles, para la expresión de proteínas recombinantes. La cepa BL21-SI de *E. coli* es deficiente en las proteasas lon y ompT. Las bacterias que son deficientes en proteasas, pueden acumular grandes cantidades de proteína recombinante y disminuir degradación de la proteína durante la purificación. Las células BL21-SI contienen el gen de la ARN T7 polimerasa integrado en el cromosoma bajo el control del promotor proU, el cual se induce con sal (Bhandari & Gowrishankar, 1997). Por otro lado el gen de interés deberá ser clonado bajo el promotor T7. La ventaja de utilizar este tipo de promotores controlables, es la alta densidad celular obtenida antes de inducir, evitando así un efecto toxico al sobre expresarse la proteína.

2.6. El sistema pET

El sistema pET es uno de los más potentes sistemas desarrollado para la clonación y expresión de proteínas recombinantes en *E. coli*. La transcripción de los genes blanco clonados en los plásmidos pET es dirigida por la señal de transcripción del bacteriófago T7. La expresión de los genes es inducida proporcionando una fuente de ARN-polimerasa T7 en la célula huésped. La RNA-polimerasa T7 es tan selectiva y activa que, cuando está totalmente inducida, casi todos los recursos de la célula son dedicados a la expresión del gen diana, por lo que el producto deseado puede comprender más de 50% de la proteína celular total unas pocas horas después de la inducción. Aunque este sistema es muy

fuerte, también es posible atenuar los niveles de expresión bajando la concentración de inductor. La ventaja en la disminución del nivel de expresión es que aunque baja el rendimiento de la proteína de interés, puede mejorar la solubilidad de la proteína diana. Otra ventaja importante de este sistema es su capacidad para mantener los genes diana transcripcionalmente silentes en el estado no inducido.

2.7. Etiquetado de proteínas con 6His

La secuencia de ADN que especifica una cadena de seis a nueve residuos de histidina se utiliza con frecuencia en los vectores para la producción de proteínas recombinantes. El resultado es la expresión de una proteína recombinante con una cola de 6His fusionada al N o C- terminal.

Las proteínas expresadas etiquetadas con 6His pueden ser purificadas y detectadas fácilmente porque la cadena de residuos de histidina se une a varios tipos de iones metálicos inmovilizados, níquel, cobalto y cobre, en condiciones de amortiguación específicos. Además, existen anticuerpos anti-6His disponibles comercialmente para su uso en inmunoensayos que involucran la detección de proteínas etiquetadas con 6His. En cualquier caso, la etiqueta de histidinas proporciona un método de purificación o específicamente la detección de la proteína recombinante sin un anticuerpo específico de la proteína o sonda.

2.7.1. Cromatografía de afinidad de metal inmovilizado (IMAC)

Para la purificación por afinidad, pequeñas cuentas de agarosa fijadas son modificadas con grupos quelantes para inmovilizar iones del metal deseado. Esto se conoce como cromatografía de afinidad de metal inmovilizado (IMAC). Los quelantes más utilizados como ligandos para IMAC son el ácido nitrilotriacético (NTA) y el ácido iminodiacético (IDA). Una vez que la resina de NTA- agarosa o IDA-agarosa se prepara, puede ser "cargada" con el divalente metálico deseado. La resina resultante suele llamarse (usando el níquel como ejemplo) agarosa Ni-

NTA o agarosa Ni-IDA. Empacadas en cartuchos de cromatografía ó columnas adecuadas, estas resinas permiten la purificación de 1 a 10 miligramos de proteína etiquetada por mililitro de agarosa.

Las etiquetas de Poli-His se unen mejor a las resinas de IMAC en condiciones de amortiguación casi neutro (pH fisiológico y la fuerza iónica). Un típico vinculante / tampón de lavado consiste en Tris-buffer salino (TBS) pH 7,2, que contiene 10-25 mm imidazol. La baja concentración de imidazol ayuda a evitar la unión inespecífica de proteínas endógenas que tienen grupos de histidina.

Las concentraciones altas de sal y desnaturalizantes determinados (por ejemplo, caotropsos como la urea 8 M) son compatibles, por lo que la purificación de las muestras en varios buffers de inicio es posible. Sin embargo, agentes reductores, agentes oxidantes y agentes quelantes (por ejemplo, EDTA) no son compatibles con esta química de afinidad.

La elución y la recuperación de la proteína etiquetada capturada en la columna de IMAC se logra con una alta concentración de imidazol (por lo menos 200 mM), un pH bajo (por ejemplo, 0,1 M glicina-HCl, pH 2,5) o un exceso de quelante fuerte (por ejemplo, EDTA). El imidazol es el agente más común de elución.

2.7.2. Níquel, cobalto y cobre

El níquel es el ión metálico de mayor disponibilidad para la purificación de proteínas etiquetadas con histidinas. El níquel en general proporciona una buena eficacia de unión a proteínas 6His-etiquetadas, pero también tiende a unir inespecíficamente a proteínas endógenas que contienen grupos de histidinas. Como se mencionó anteriormente, una pequeña cantidad de imidazol en el tampón de unión / lavado ayuda a controlar la unión de proteínas contaminantes.

El cobalto presenta una interacción más específica con la etiqueta de histidinas, lo que resulta en una menor interacción inespecífica. Por esta razón, el cobalto es el catión divalente preferido para la purificación de proteínas 6His-etiquetadas cuando la alta pureza es una preocupación primordial.

Los iones de cobre se unen a las proteínas etiquetadas con más fuerza que el cobalto o el níquel. Esto proporciona una capacidad de unión más alta, pero también la especificidad más pobre. Por esta razón, la IMAC cobre suele utilizarse sólo para aplicaciones de unión en el que la purificación no es el objetivo (tomado de http://www.piercenet.com/files/1602015_PurifHB_INT.pdf).

3. Objetivos

3.1. Objetivo general

Caracterizar la actividad enzimática y generar un modelo estructural teórico de una superóxido dismutasa recombinante proveniente del pasto antártico *Deschampsia antarctica* E. Desv. producida en *Escherichia coli*.

3.2. Objetivos específicos

Utilizando herramientas bioinformáticas, realizar un modelamiento de la superóxido dismutasa procedente de *Deschampsia antarctica* E. Desv (DaSOD).

Demostrar la función bioquímica de la DaSOD recombinante.

Determinar los parámetros cinéticos de la DaSOD recombinante.

4. Materiales y métodos

4.1. Medios de cultivo

La cepa *E. coli* BL21-SI/pDaSOD se cultivó de forma rutinaria en placas con medio LBON (triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, agar 15 g/L) suplementado con 100 µg/mL de kanamicina (Sigma). El medio mínimo para la expresión y producción de DaSOD contenía, por L: 5 g de glucosa, 3.5 g (NH₄)₂HPO₄, 3.5 g KH₂PO₄, 1.0 g MgSO₄, 40 mg tiamina y 50 mg kanamicina. El pH se ajustó a 7.0 antes de esterilizar el medio por autoclave durante 15 min a 121°C. Los preinóculos se hicieron en 100 mL de medio mínimo adicionado con 0.5% de extracto de levadura (Difco Labs, Franklin Lakes, NJ) y se incubaron durante toda la noche a 250 rpm y 37°C.

4.2. Cultivo en Lote

Los cultivos en lote se realizaron en un birreactor de 1.3-L (Applikon, Schiedam, Netherlands) equipado con dos turbinas Rushton con seis paletas cada una y agitadas a 300 rpm. Se inició con 1 L de medio mínimo y una densidad óptica a 600 nm (OD_{600nm}) inicial de 0.2 y se crecieron a 37°C hasta alcanzar una OD_{600nm} de 0.6. En este punto, la expresión del gen que codifica para la DaSOD se indujo con 0.3 M de NaCl y la temperatura de post inducción se disminuyó a 32.5°C. Durante los experimentos, el pH y el oxígeno disuelto se mantuvieron a 7.0 y 20%, respectivamente, usando un Bio-controlador ADI-1030 (Applikon, Schiedam, Netherlands) y el software BioXpert v1.3 (Applikon, Schiedam, Netherlands). Se colectaron muestras de 3 mL del cultivo cada hora, las células se cosecharon por centrifugación a una velocidad de 16,000 x g durante 2 min a una temperatura de 4°C., se resuspendieron en PBS y se rompieron con un procesador ultrasónico GE 505 (Sonics, Newtown, CT) para su análisis posterior. El ciclo usado para el rompimiento fue: 10 pulsos de 10 s con una amplitud de 25% y 10 s de descanso durante cada pulso. La fracción soluble del lisado se

recuperó por centrifugación a 8,000 x g durante 15 min y 4°C de temperatura, en una centrifuga RC5C plus (Sorvall, Stevenage, United Kingdom).

4.3. Purificación de DaSOD

La proteína se purificó en una columna de agarosa-Ni-NTA con el sistema ProBond Purification System, siguiendo las indicaciones del proveedor (Invitrogen; Carlsbad, CA, USA). El extracto celular se incubó con la resina de agarosa níquel equilibrada (Anexo 1) y se dejó en agitación durante 3 horas a una temperatura de 4°C para permitir la unión de la proteína a 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 3 horas a 4°C, al término se dejó asentar la resina y se eluyó el buffer. La proteína eluída de la columna de afinidad se ultra dializó contra buffer 10 mM Tris-HCl pH 7.5 en celdas con agitación Amicon (Millipore) con membranas de ultrafiltración (Ultracel YM-10 Millipore) por tres horas a 4°C .

4.4. Detección de la enzima His₆-DaSOD por Western blot

La proteína His₆-DaSOD purificada por columna de afinidad se separó por mediante SDS-PAGE en un gel de gradiente de poliacrilamida (4-20%) y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ), usando una cámara horizontal de transferencia semi-Seca (Bio Rad, Hercules, CA, USA). La proteína recombinante His₆-DaSOD se detectó por inmunoblot. El anticuerpo Monoclonal Anti-poli Histidina (isotipo IgG1 de ratón, AbD serotec; Oxford, U.K.) se usó como anticuerpo primario a una concentración de 0.2 µg mL⁻¹ .Un anticuerpo cabra Anti-Ratón IgG acoplado a fosfatasa alcalina se utilizó como anticuerpo secundario a la dilución de 1:3000 en 1% de BSA (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). El inmunoblot se reveló con *p*-nitro azul de tetrazolio y 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato (NBT/BCIP, Amersham Biosciences;

Piscataway, NJ). El análisis de los inmunoblots se llevó a cabo utilizando un documentador de fotos Gel-Doc 2000 (BioRad, Segrate, Milán) y el programa Quantity One™ v4.5 (BioRad, Segrate, Milán).

4.5. Actividad enzimática de la DaSOD

La actividad de DaSOD fue revelada mediante el método fotoquímico descrito por Beauchamp y Fridovich (Beauchamp & Fridovich, 1971) como sigue: 3 μ L de la proteína purificada se separaron por electroforesis en un gel de gradiente 4-20% SDS-PAGE. La electroforesis se llevó a cabo en un cuarto frío a 4°C y 100 V por 4 h aproximadamente. Después de esto, los geles se lavaron dos veces durante 25 min con buffer renaturalizante que contenía: 50 mL de buffer Tris-HCl 10 mM (pH 7.9) y 25% (v/v) de isopropanol. Por último, se reveló la actividad en los geles. Para ello los geles primero se incubaron durante 25 min en buffer de fosfatos 50 mM (pH 7.8), que contenía (p/v) 2.5 mM p-nitro azul de tetrazolio (NBT, USB Co, Cleveland OH), se lavaron brevemente y se incubaron durante 15 min con 25 mL de buffer de fosfatos 50 mM (pH 7.8) conteniendo 1.1 mM de riboflavina (Sigma, St. Louis, MO) y 1.4 mM de TEMED (Invitrogen; Carlsbad, CA, USA), los geles se lavaron 3 veces con agua milliQ y se expusieron a un lámpara de luz blanca de 50 watts durante 5 min o hasta que las bandas de actividad aparecieron. La SOD de hígado de bovino (**Sigma**; St. Louis, Missouri) se utilizó como control positivo para demostrar la reproducibilidad de la técnica.

4.6. Modelamiento de la DaSOD y análisis de la presencia de iones metálicos

La estructura tridimensional de la proteína recombinante DaSOD se realizó con el servidor de modelamiento comparativo de proteínas PROTEIN SWISS MODEL, utilizando como templado el monómero 2q2lB perteneciente a la Cu-ZnSOD de la planta *Potentilla astrisanguinea*. Los iones metálicos de la proteína recombinante

purificada y dializada fueron determinados por espectroscopía de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES) usando un espectrofotómetro Varian model 730 (Palo Alto, CA).

4.7. Métodos Analíticos

El crecimiento celular se monitoreo a una OD_{600nm} usando un espectrofotómetro (Varian Cary BIO-50, Palo Alto, CA). La concentración de la proteína purificada se analizó por el método de Lowry (Lowry et al, 1951) usando albumina sérica bovina (BioRad, Hercules, CA) como estándar, las proteínas se separaron en un gel SDS-PAGE de gradiente discontinuo 4–20% y se visualizaron mediante tinción con 0.1% (w/v) de colorante Coomassie Brilliant Blue R250 (BioRad). El análisis densitométrico de los geles de acrilamida y los zimogramas se llevó a cabo usando el software Quantity One™ v4.5 (BioRad). La actividad específica de DaSOD se determinó por el método en solución descrito por McCord y Fridovich (1969) con algunas modificaciones, como se describe a continuación: a una celdilla de cuarzo de 3 cm^3 se le agregaron 3 mL de buffer de reacción que contenía (p/v) 13 mM de L-metionina, 0.1 mM de EDTA, 75 μM de NBT disueltos en PBS al 50 mM (pH 7.8) y 3 μL de la enzima purificada, ó 3 μL de agua como control negativo. Al tiempo cero se agregaron a la mezcla de reacción 2 μM de riboflavina y la celdilla fue expuesta a una fuente de luz blanca utilizando un diodo emisor de luz (LED) ultrabrillante marca STEREN de 3 mm con una intensidad luminosa de 3800 a 4000 mcd (milicandelas) adaptado a corriente alterna, a una distancia de 3 cm de la celdilla. La reducción de NBT se monitoreo durante 10 min a 560 nm usando un espectrofotómetro Cary BIO-50 (Varian, Palo Alto, CA) acoplado con un Peltier (Varian, Palo Alto, CA) para control de temperatura. Las mediciones se realizaron tres veces y el promedio fue utilizado para el análisis de resultados. Definiendo a una unidad de actividad como la cantidad de enzima que produce un 50% de la máxima inhibición causada por la enzima sobre la reducción del NBT (McCord & Fridovich, 1969).

4.8. Pruebas de inhibición de DaSOD

Para realizar las pruebas de inhibición, a la mezcla de reacción descrita en el apartado 4.7 se agregaron por separado, 5 mM de H₂O₂, 10 mM de KCN y 5 mM de azida de sodio (Kanematsu & Asada, 1991), seguido por la detección fotoquímica en solución (Beauchamp & Fridovich, 1971). Para estudiar la actividad de DaSOD a -20°C los geles se revelaron como se indicó con anterioridad, excepto que las soluciones de NBT y Riboflavina contenían 50% de glicerol para evitar el congelamiento. También se determinó la actividad enzimática después de esterilizar la enzima a una presión de 15 lb y 121°C.

4.9. Efecto de la temperatura y el pH sobre la actividad de la DaSOD

Para determinar el efecto de la temperatura sobre la actividad de la DaSOD, alícuotas de 5 µL de la enzima purificada fueron sometidas a temperaturas desde 50 hasta 110°C, con incrementos de 10°C, durante un periodo de tiempo de 60 min con incrementos de 10 min, en un termociclador iCycler (BioRad; USA). La actividad relativa de la enzima sometida a los diferentes tratamientos se determinó mediante el método de reducción del NBT en solución. El efecto del pH sobre la actividad de la DaSOD se determinó incubando alícuotas de 5 µL de la DaSOD purificada, en 145 µL de distintos amortiguadores a pH 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10, durante un periodo de tiempo de 12 h. Los amortiguadores contenían respectivamente: KCl/HCl 50 mM (pH 2), glicina/HCl 50 mM (pH 3), CH₃COOH/CH₃COONa 50 mM (pH 4-5), KH₂PO₄/NaOH 50 mM (pH 6-8), glicina/NaOH (pH 9-10). La actividad relativa de la enzima sometida a los diferentes amortiguadores se determinó mediante el método de reducción del NBT en solución.

5. Resultados y Discusión

5.1. Análisis de la secuencia de DaSOD y Modelamiento

La secuencia aminoacídica de la proteína DaSOD fue sometida al servidor SWISS MODEL para su modelamiento usando el modo automático. El programa construyó el modelo de la DaSOD usando como templado la unidad biológica identificada como 2q2IB que muestra un porcentaje de identidad de 82.237 % con la DaSOD, pudiendo asumir que la estructura cuaternaria de nuestra proteína es prácticamente idéntica a la del templado (Figura 5). El templado 2q2IB pertenece a uno de los monómeros de una Cu-Zn-SOD inducida por bajas temperaturas de la planta *Potentilla astrisanguinea* (Yogavel et al, 2007). Este resultado es interesante ya que *P. astrisanguinea* es la única planta que se desarrolla en el oeste de los montes Himalayas, India, bajo condiciones ambientales extremas de alta radiación UV y temperaturas bajas, similares a las que soporta *D. antarctica*. Adicionalmente, el diagrama ANOLEA (Atomic Non-Local Environment Assessment) que realiza los cálculos de la energía favorable de la estructura proteínica predicha (Chodanowski et al, 2008), da fiabilidad al modelo, ya que la mayoría de las regiones donde se encuentran los elementos estructurales clave para la actividad de DaSOD están en zonas favorables (zonas marcadas en verde) (Figura 6). La DaSOD presenta una estructura dimérica conformada por dos subunidades idénticas. Cada monómero contiene a la vez, un barril de ocho cadenas, con siete loops (Perry et al) . Para ver una descripción más detallada ir a la Figura 7. Las principales diferencias estructurales observadas entre la DaSOD y la PaSOD se encuentran principalmente en los loops disulfuro y el Greek key (Figura 8).

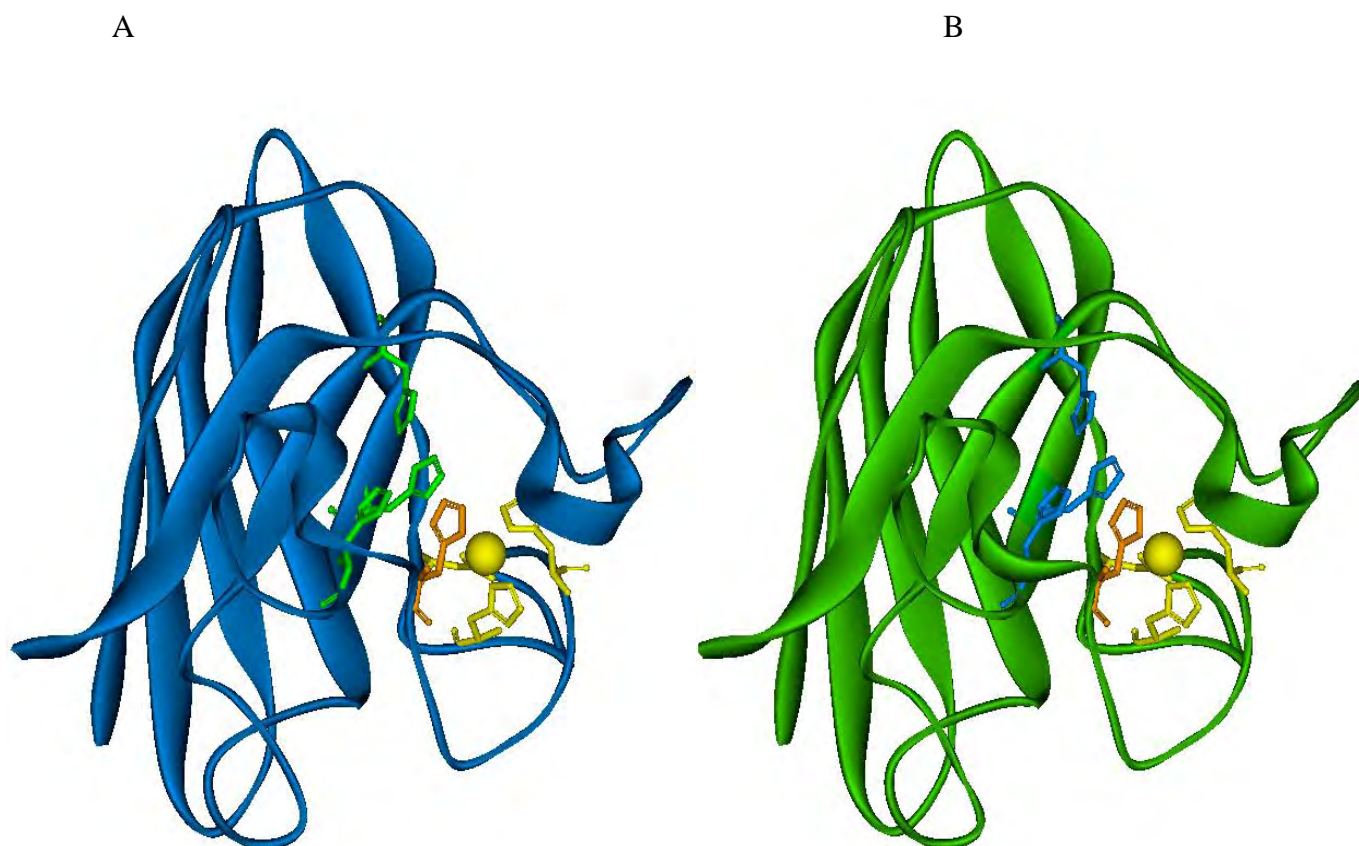


Fig. 5. Modelos en 3D de la Cu-Zn SOD de *D. antarctica* (A) y el templado 2q2IB (B) generadas en SWISS MODEL. En ambas figuras se pueden observar los aminoácidos involucrados en la coordinación del ión Zn^{+2} (en color amarillo) y la histidina puente (en color naranja), que coordina a los iones Zn^{+2} y Cu^{+2} . En verde y azul, se muestran las histidinas involucradas en la coordinación del ion Cu^{+2} , para las Cu-Zn de *D. antarctica* y 2q2IB (*P. astrisanguinea*), respectivamente.

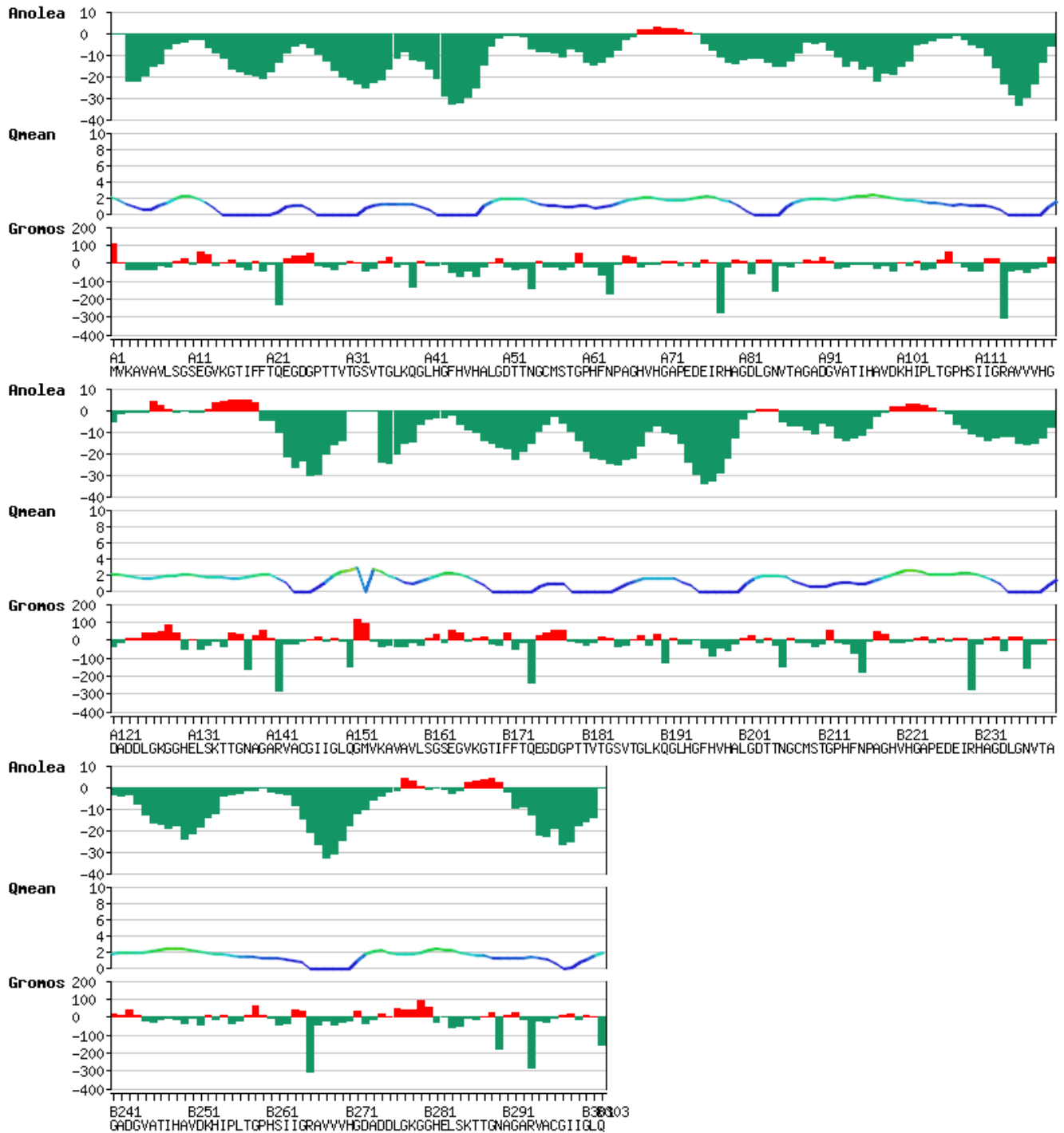


Fig. 6. Gráfico Anolea de evaluación del modelo predicho. En verde, regiones de energía favorable de la estructura predicha. En rojo, zonas de energía alta, más desfavorables.

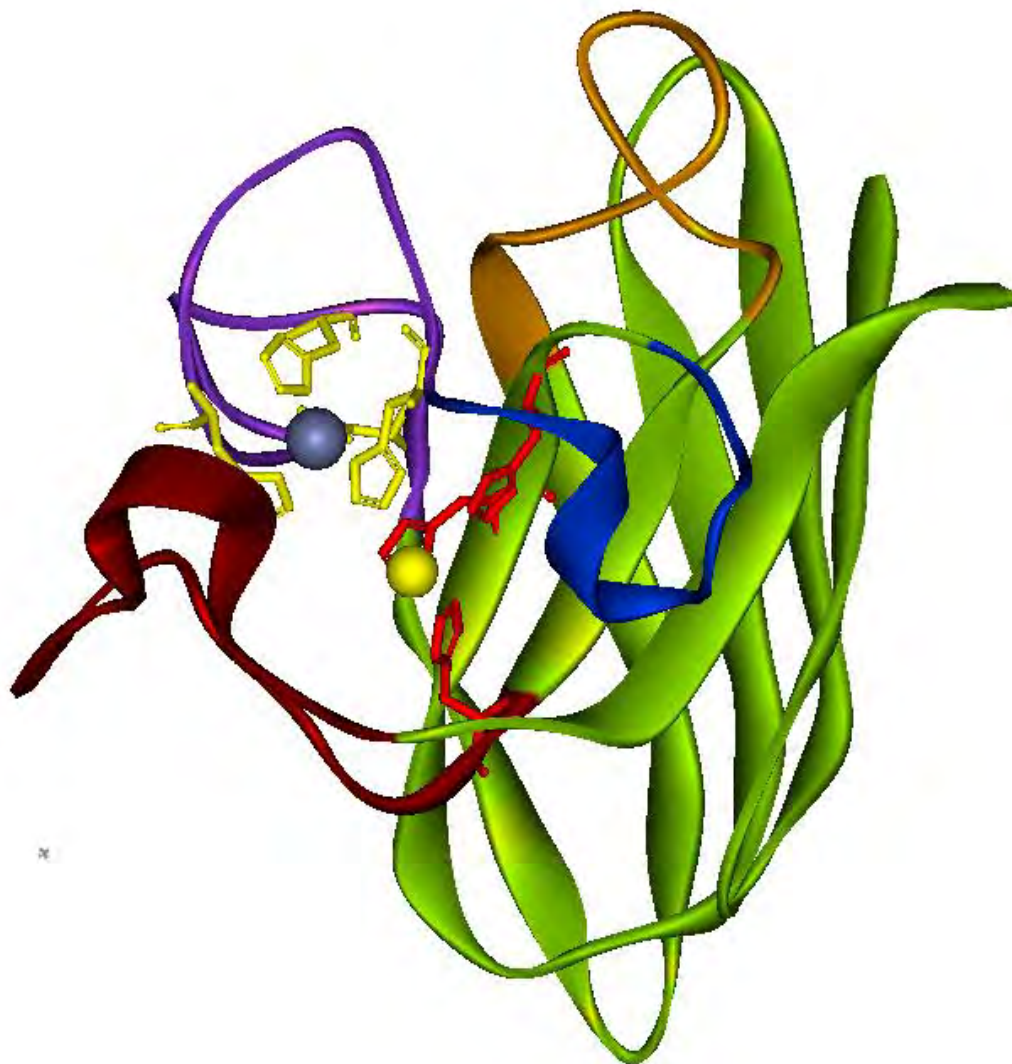


Fig. 7. Estructura de DaSOD. Cada monómero está conformado por una estructura de barril compuesto por ocho cadenas y siete loops. El sub-loop di-sulfuro comprende los residuos 50–61 (azul), la región de unión al Zn^{+2} 62-83 (morado), el loop Greek-key 100-113 (naranja) y el loop electrostático (ocre). El Zn^{+2} y el Cu^{+2} , están representados como una esfera gris y amarilla respectivamente.



Fig. 8. Sobreimposición de DaSOD y PaSOD. Se muestran las diferencias encontradas en los loops Greek key y disulfuro con flechas verde y azul respectivamente.

5.2. Expresión, inmunodetección y purificación de DaSOD recombinante

Se tomaron alícuotas de 1 mL del cultivo en lote de *E. coli* BL21-SI/pDaSOD, las células se cosecharon y se sonicaron como se describe en la sección de Materiales y Métodos. La producción máxima de la proteína DaSOD se alcanzó a las cuatro horas del cultivo después de la inducción con 0.3 M de NaCl (Figura 9). Mediante el análisis electroforético de un gel de SDS-PAGE teñido con azul de commassie se pudo observar la inducción por NaCl 0.3 M de una proteína con una masa molecular aproximada de 16 kDa, que corresponde a la masa molecular predicha de la DaSOD mas la cola-6His, datos que coinciden con lo reportado por (García Echaury et al, 2009). Una vez que se analizó la producción de la proteína DaSOD, esta se purificó mediante una columna de afinidad Ni-NTA, utilizando condiciones restrictivas para evitar la unión de proteínas contaminantes, como lo indica el proveedor. Adicionalmente, se realizó un análisis de inmunodetección mediante Western blot, en el que se utilizó un anticuerpo monoclonal contra la cola-6His contenida en la proteína recombinante, el ensayo detecta una sola banda de 16 kDa que corresponde a la DaSOD fusionada con la cola-6His (Figura 10), demostrando que la enzima purificada se trata de la DaSOD recombinante. Un resultado inesperado obtenido durante el ensayo de inmunodetección de la proteína fue el reconocimiento por el anticuerpo anti- 6His de cada una de las bandas de peso molecular del líder proteico (BioRad), esto permitió determinar con más claridad el peso de la proteína purificada, y puede ser una estrategia útil para marcar las bandas del marcador de peso de proteínas purificadas mediante cromatografía de afinidad Ni-NTA detectadas mediante inmunoblot con el anticuerpo Anti-6His, esto evitaría la necesidad de cortar la membrana de nitrocelulosa y el uso de tinciones que ofrecen poca resolución de los marcadores. Por último, para demostrar la pureza de la proteína DaSOD se realizó un análisis densitométrico en SDS-PAGE teñido con plata, de alícuotas de 3 μ l de distintas fracciones eluidas de la columna de afinidad, demostrándose que la proteína tiene como mínimo un 97 % de pureza, ya que la tinción utilizada es de 10 a 100 veces más sensible que la tinción con azul de commassie y no se aprecian bandas

contaminantes (Figura 11). La pureza de la de la DaSOD recombinante, puede ser suficiente como para ser utilizada en ensayos de cristalización y posterior análisis mediante difracción de rayos X.

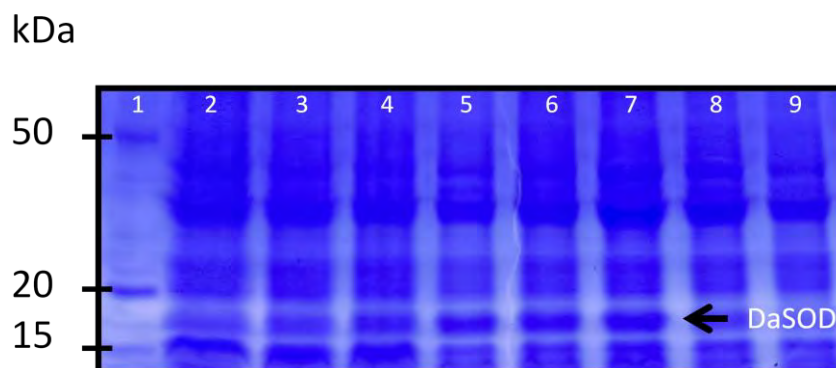


Fig. 9. Análisis de la producción en biorreactor de DaSOD inducida por NaCl en *E. coli*. Carril 1, marcador de peso molecular; Carril 2, muestra de extracto celular total, tomada antes de la inducción con NaCl 0.3 M. Carriles 3-9 muestras de extracto celular total tomadas a las 1-7 horas post inducción. La flecha indica la posición de la DaSOD recombinante.

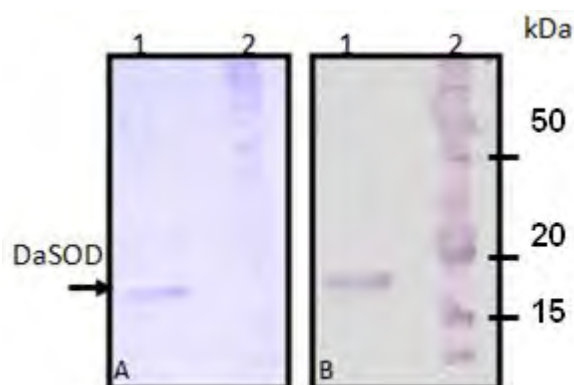


Fig. 10. Inmunodetección con anti-His₆ de la DaSOD recombinante purificada. A) Análisis SDS-PAGE de la proteína DaSOD purificada mediante cromatografía de afinidad en una columna de agarosa-Ni-NTA. Carril 1, 10 μ L de muestra de la DaSOD eluída; Carril 2, marcador de peso molecular. B) Inmunoblot, del gel SDS-PAGE mostrado en A.

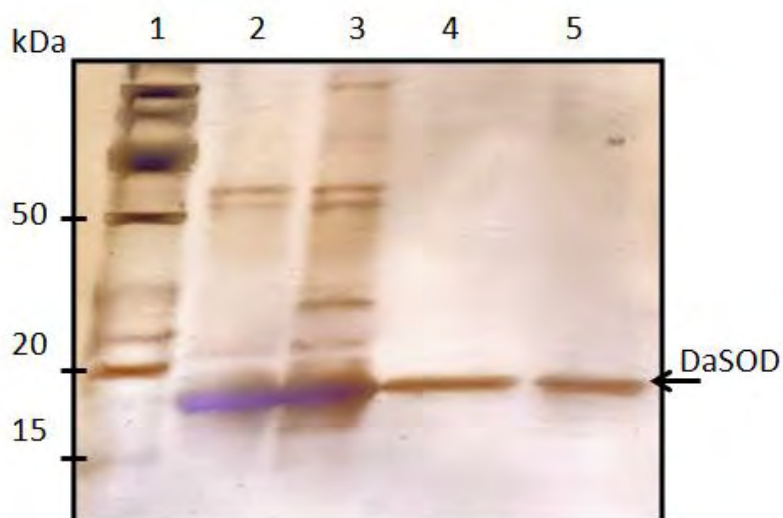


Fig. 11. Análisis de la pureza de la His₆-DaSOD mediante SDS-PAGE. 10 mL de la resina y de diferentes fracciones eluidas de la columna de agarosa-Ni-NTA fueron sometidos a electroforesis y el gel fue teñido con AgNO₃. Carril 1, Marcador de peso molecular; Carril 2-5, Distintas fracciones de la proteína eluida con imidazol de la columna de afinidad.

5.3. Caracterización enzimática de DaSOD

La actividad de la DaSOD se determinó por el método de inhibición de la reducción de NBT (Beauchamp y Fridovich, 1971) en gel. Como se muestra en la Figura 12 el método (a 25°C) revela la presencia de una sola banda de actividad que corresponde al peso molecular esperado de la proteína DaSOD purificada, demostrando que es activa enzimáticamente. Los ensayos de actividad en solución en la presencia de 5 mM de H₂O₂ ó 10 mM de KCN inhiben en su totalidad la actividad de la enzima, apoyando la idea de la pertenencia de DaSOD a la familia de las Cu-Zn SODs. Por último, para corroborar el contenido de iones metálicos presentes en la estructura de la DaSOD recombinante, se realizó un análisis de la enzima por espectroscopía de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES), como se describió en materiales y métodos (Tabla 1). Además del Cu y el Zn, se cuantificaron los niveles de otros metales característicos presentes en las SODs (Fe, Mn, Ni). El análisis muestra que la

DaSOD recombinante contiene Cu y Zn en una proporción de 0.107166 y 0.179067 $\mu\text{g-átomo/mg}$ de proteína, lo que demuestra que es una metaloproteína dependiente de Cu y Zn (Tabla 1).

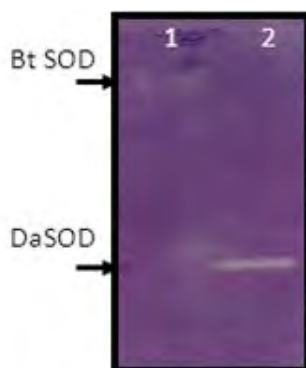


Fig. 12. Determinación de la actividad de DaSOD en gel. Carril 1: Control positivo de la actividad enzimática (se utilizaron 3u de Cu-Zn SOD de hígado de bovino). Carril 2: Actividad enzimática de la DaSOD purificada.

Tabla 1. Análisis de la presencia de iones metálicos en DaSOD.

Metal	$\mu\text{g-átomo/mg}$ de proteína
Cu	0.107166 ± 0.001083
Fe	0.027232 ± 0.000589
Mn	0.029512 ± 0.000047
Ni	0.085656 ± 0.003682
Zn	0.179067 ± 0.001019

*El contenido metálico de la enzima por ICP-OES se realizó como se describe en materiales y métodos. Los valores presentados son el promedio de tres mediciones independientes.

5.4. Determinación de temperatura y pH óptimos

La temperatura óptima de actividad de la DaSOD se determinó controlando la temperatura del porta celda de reacción de 10 a 70°C. El pH óptimo se determinó al monitorear la actividad enzimática a una temperatura de 25°C en un rango de pH 2 a 10. Como se puede observar en la Figura 13, la temperatura óptima de reacción de DaSOD se encuentra entre los 10 y 30°C, con un máximo a 20°C, que disminuye conforme aumenta la temperatura de 40 hasta 70°C. Es importante mencionar que la enzima presenta únicamente una disminución del 20% de la actividad máxima al ser incubada a 0°C y que presenta actividad detectable cuando es incubada a -20°C (Fig. 14). Estos datos indican claramente que la enzima recombinante DaSOD pertenece a un tipo muy reducido de SODs activas a temperaturas frías (0°C) (Zheng et al, 2006) y la segunda en su tipo activa a temperaturas de congelación (-20°C) (Sahoo et al, 2001). Como se puede observar en la Figura 15 la DaSOD mantiene una actividad de más del 90% en un rango de pH de 5 a 8, siendo el pH óptimo de 7.0, mientras que la enzima muestra una caída drástica en la actividad relativa a pH inferiores a 5 y superiores a 8.

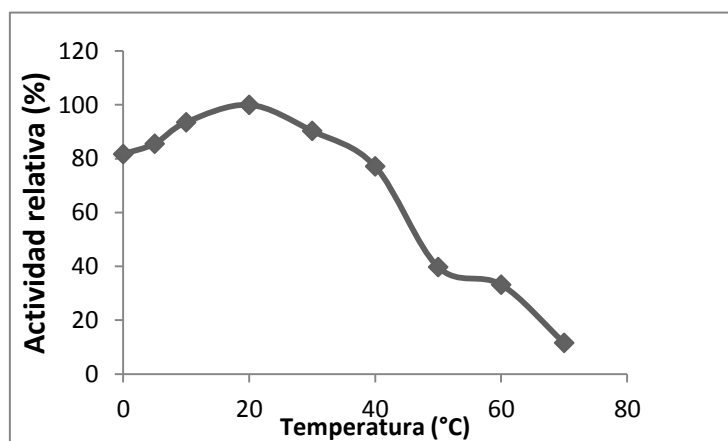


Fig. 13. Temperatura óptima de actividad de DaSOD. La temperatura óptima de actividad de la proteína fue determinada mediante ensayos de inhibición de la reducción de NBT en solución, con la ayuda de un porta celda con temperatura controlada de 0 a 70°C.



Fig. 14. Actividad *in situ* de la DaSOD a -20°C. La actividad de DaSOD fue determinada por el método fotoquímico en gel en presencia de 50% de glicerol.

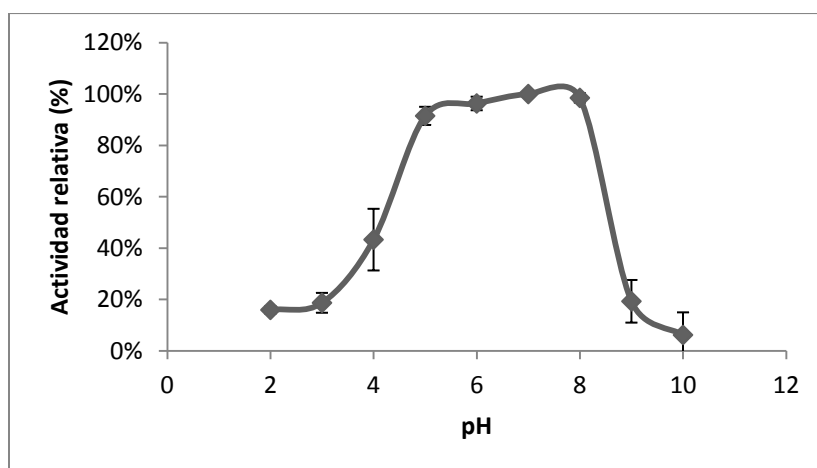


Fig. 15. Análisis del efecto del pH sobre la actividad de DaSOD. 5 μL de la DaSOD purificada, se incubaron en un volumen de 145 μL de distintos amortiguadores a pHs de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10, durante un periodo de tiempo de 12 h, posteriormente, la actividad relativa fue determinada mediante ensayos de inhibición de la reducción de NBT en solución.

5.5. Termoestabilidad de la DaSOD

Los ensayos de termoestabilidad de la DaSOD, demostraron que a pesar de ser una enzima que tiene una actividad catalítica preferente a temperaturas bajas, posee una gran termoestabilidad, algo poco común para una enzima psicrófila y que solo tiene comparativo con la Cu-ZnSOD de *P. astrisanguinea*, una enzima con actividad a bajas temperaturas (-20°C) y que muestra gran estabilidad a altas temperaturas (121°C) (Sahoo et al, 2001), sin embargo, como se puede observar en la Figura 2, la DaSOD posee una termorresistencia menor a la PaSOD, con un tiempo de vida media aproximado de 30 min a 100°C (Figura 16).

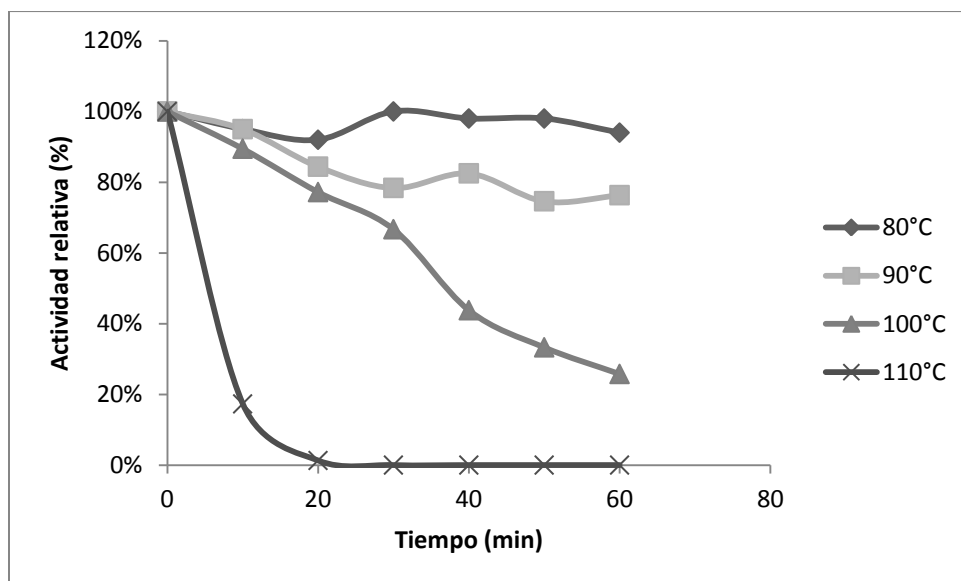


Fig. 16. Análisis de la termoestabilidad de la DaSOD. 5 μ L de la enzima purificada fueron sometidas a temperaturas desde 50 hasta 110°C, con incrementos de 10°C, durante un periodo de tiempo de 60 min con incrementos de 10 min.

5.6. Determinación de parámetros cinéticos

Mediante el análisis de la inhibición de la fotorreducción del NBT por el método espectrofotométrico en solución, se pudo determinar que la enzima tiene una actividad específica de 5,818 U/mg a 25°C y pH 7.2 (Figura 16). Como se puede observar en la Figura 16, el porcentaje de inhibición de la fotorreducción del NBT no es lineal con la concentración de DaSOD agregada y muestra una cinética típica de Michaelis-Menten. Bajo las condiciones de nuestro ensayo, la K_m que está dada en función de la concentración del NBT y determina las afinidades de la DaSOD y el NBT por el O_2^- , fue de 0.17188 $\mu\text{g/mL}$. Considerando que la DaSOD es una proteína homodimérica de 30, 262 Da (García Echauri et al, 2009), se puede deducir que la DaSOD tiene una k' de 5.679 pM.

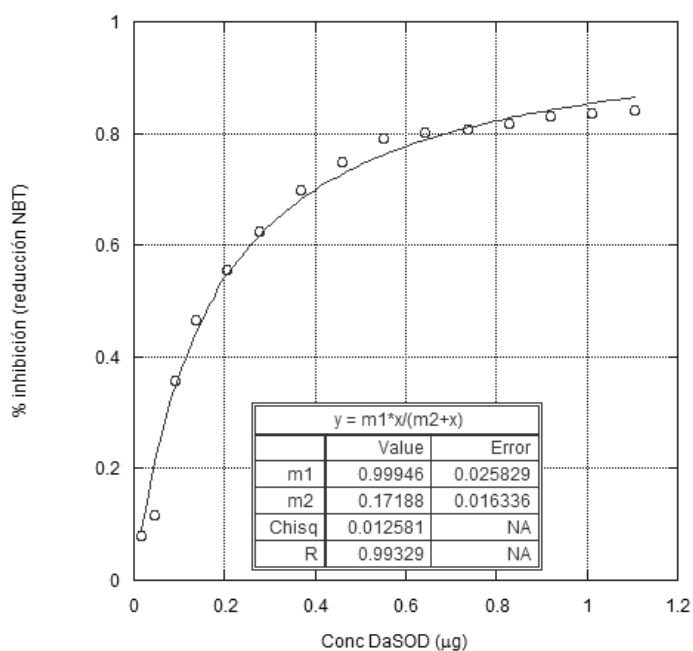


Fig. 17. Inhibición de la fotorreducción del NBT contra el aumento de la concentración de DaSOD purificada.

6. Conclusiones

La secuencia aminoacídica de la enzima Cu-ZnSOD de *Deschampsia antarctica* posee una homología de 82.237% con la secuencia del monómero 2q2IB perteneciente a la Cu-ZnSOD de *Potentilla astrisanguinea*, indicando su alta similitud, tanto estructural como funcional.

El análisis comparativo de los modelos DaSOD vs PaSOD, demostraron pequeños cambios en los *loops* disulfuro y Greek key, que se cree están involucrados en dar estabilidad a la estructura de la enzima.

Se logró obtener la enzima recombinante DaSOD en un alto grado de pureza (más del 97%) mediante cromatografía de afinidad Ni-NTA, como lo demuestra el gel SDS-PAGE teñido con AgNO₃.

La proteína purificada demostró ser enzimáticamente activa a bajas temperaturas, presentando una mayor actividad a temperatura moderada de 20°C; sin embargo, solo pierde un 20% de su actividad total a temperatura de refrigeración (0°C) y demostró actividad significativa a temperatura de congelamiento (-20°C).

La DaSOD demostró una gran termoestabilidad, tal como su homóloga PaSOD, y hasta el momento, es el segundo reporte de una Cu-ZnSOD con actividad a temperaturas de congelamiento y resistencia a temperaturas altas. Los ensayos de inhibición de la reducción del NBT en solución, demostraron que la enzima es sensible a H₂O₂ y KCN apoyando la idea de que se trata de una Cu-ZnSOD, además, el análisis por ICP-OES demostró la presencia en la molécula de la DaSOD de los iones Cu y Zn, indicando que se trata de una metaloenzima dependiente de Cu y Zn.

7. Perspectivas

Realizar ensayos de cristalización para determinar la estructura molecular de la DaSOD mediante difracción de rayos X.

Determinar su actividad *in vivo* mediante la transformación de plantas modelo o bacterias.

Generación de plantas transgénicas tolerantes a bajas temperaturas.

8. Referencias

Armstrong WD (1958) The chemical basis of radiation damage. *Postgrad Med* **23**(5): 499-507

Aruoma OI, Halliwell B, Gajewski E, Dizdaroglu M (1991) Copper-ion-dependent damage to the bases in DNA in the presence of hydrogen peroxide. *Biochem J* **273** (Pt 3): 601-604

Ballester M (1996) [Anti-oxidants, free radicals, and health. A chemical, organic, and physical approach]. *Med Clin (Barc)* **107**(13): 509-515

Baneyx F (1999) Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol* **10**(5): 411-421

Baneyx F, Mujacic M (2004) Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nat Biotechnol* **22**(11): 1399-1408

Bannister JV, Parker MW (1985) The presence of a copper/zinc superoxide dismutase in the bacterium *Photobacterium leiognathi*: a likely case of gene transfer from eukaryotes to prokaryotes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**(1): 149-152

Bannister WH, Bannister JV, Barra D, Bond J, Bossa F (1991) Evolutionary aspects of superoxide dismutase: the copper/zinc enzyme. *Free Radic Res Commun* **12-13 Pt 1**: 349-361

Beauchamp C, Fridovich I (1971) Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem* **44**(1): 276-287

Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA (1990) Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(4): 1620-1624

Beem KM, Rich WE, Rajagopalan KV (1974) Total reconstitution of copper-zinc superoxide dismutase. *J Biol Chem* **249**(22): 7298-7305

Bhandari P, Gowrishankar J (1997) An *Escherichia coli* host strain useful for efficient overproduction of cloned gene products with NaCl as the inducer. *J Bacteriol* **179**(13): 4403-4406

Bielski BH, Arudi RL, Sutherland MW (1983) A study of the reactivity of HO₂/O₂- with unsaturated fatty acids. *J Biol Chem* **258**(8): 4759-4761

Boveris A, Cadenas E (1975) Mitochondrial production of superoxide anions and its relationship to the antimycin insensitive respiration. *FEBS Lett* **54**(3): 311-314

Boveris A, Chance B (1973) The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J* **134**(3): 707-716

Bowler C, Van Camp W, Van Montagu M, Inzé D (1994) Superoxide dismutases in plants. *Critical Reviews in Plant Science* **13**

Crane BR, Arvai AS, Gachhui R, Wu C, Ghosh DK, Getzoff ED, Stuehr DJ, Tainer JA (1997) The structure of nitric oxide synthase oxygenase domain and inhibitor complexes. *Science* **278**(5337): 425-431

Chance B, Sies H, Boveris A (1979) Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* **59**(3): 527-605

Cheeseman KH, Slater TF (1993) An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull* **49**(3): 481-493

Chodanowski P, Grosdidier A, Feytmans E, Michielin O (2008) Local alignment refinement using structural assessment. *PLoS One* **3**(7): e2645

Fisher CL, Cabelli DE, Hallewell RA, Beroza P, Lo TP, Getzoff ED, Tainer JA (1997) Computational, pulse-radiolytic, and structural investigations of lysine-136 and its role in the electrostatic triad of human Cu,Zn superoxide dismutase. *Proteins* **29**(1): 103-112

Fisher CL, Cabelli DE, Tainer JA, Hallewell RA, Getzoff ED (1994) The role of arginine 143 in the electrostatics and mechanism of Cu,Zn superoxide dismutase: computational and experimental evaluation by mutational analysis. *Proteins* **19**(1): 24-34

Forman HJ, Fridovich I (1973) On the stability of bovine superoxide dismutase. The effects of metals. *J Biol Chem* **248**(8): 2645-2649

Forsmark P, Aberg F, Norling B, Nordenbrand K, Dallner G, Ernster L (1991) Inhibition of lipid peroxidation by ubiquinol in submitochondrial particles in the absence of vitamin E. *FEBS Lett* **285**(1): 39-43

Frankel EN (1984) Chemistry of free radical and singlet oxidation of lipids. *Prog Lipid Res* **23**(4): 197-221

Fridovich I (1976) Superoxide dismutases: studies of structure and mechanism. *Adv Exp Med Biol* **74**: 530-539

Fridovich I (1986) Superoxide dismutases. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* **58**: 61-97

Fridovich I (1989) Superoxide dismutases. An adaptation to a paramagnetic gas. *J Biol Chem* **264**(14): 7761-7764

García Echauri SA, Gidekel M, Gutiérrez Moraga A, Ordóñez LG, Rojas Contreras JA, Barba de la Rosa AP, de León Rodríguez A (2009) Heterologous expression of a novel psychrophilic Cu/Zn superoxide dismutase from *Deschampsia antarctica*. *Journal Process Biochemistry* **44**(9): 969-974

Getzoff ED, Cabelli DE, Fisher CL, Parge HE, Viezzoli MS, Banci L, Hallewell RA (1992) Faster superoxide dismutase mutants designed by enhancing electrostatic guidance. *Nature* **358**(6384): 347-351

Getzoff ED, Tainer JA, Stempien MM, Bell GI, Hallewell RA (1989) Evolution of CuZn superoxide dismutase and the Greek key beta-barrel structural motif. *Proteins* **5**(4): 322-336

Getzoff ED, Tainer JA, Weiner PK, Kollman PA, Richardson JS, Richardson DC (1983) Electrostatic recognition between superoxide and copper, zinc superoxide dismutase. *Nature* **306**(5940): 287-290

Gielwanowska I, Szczuka E, Bednara J, Gorecki R (2005) Anatomical features and ultrastructure of *Deschampsia antarctica* (Poaceae) leaves from different growing habitats. *Ann Bot* **96**(6): 1109-1119

Hallewell RA, Imlay KC, Lee P, Fong NM, Gallegos C, Getzoff ED, Tainer JA, Cabelli DE, Tekamp-Olson P, Mullenbach GT, et al. (1991) Thermostabilization of recombinant human and bovine CuZn superoxide dismutases by replacement of free cysteines. *Biochem Biophys Res Commun* **181**(1): 474-480

Halliwell B (1989) Tell me about free radicals, doctor: a review. *J R Soc Med* **82**(12): 747-752

Halliwell B, Chirico S (1993) Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am J Clin Nutr* **57**(5 Suppl): 715S-724S; discussion 724S-725S

Halliwell B, Gutteridge JM (1984) Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage, and antioxidant therapy. *Lancet* **1**(8391): 1396-1397

Halliwell B, Gutteridge JM (1986) Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch Biochem Biophys* **246**(2): 501-514

Halliwell B, Gutteridge JM, Cross CE (1992) Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? *J Lab Clin Med* **119**(6): 598-620

Hughes KA, Lawley B, Newsham KK (2003) Solar UV-B radiation inhibits the growth of Antarctic terrestrial fungi. *Appl Environ Microbiol* **69**(3): 1488-1491

Kanematsu S, Asada K (1978) Superoxide dismutase from an anaerobic photosynthetic bacterium, *Chromatium vinosum*. *Arch Biochem Biophys* **185**(2): 473-482

Kanematsu S, Asada K (1991) Chloroplast and cytosol isozymes of CuZn-superoxide dismutase: their characteristic amino acid sequences. *Free Radic Res Commun* **12-13 Pt 1**: 383-390

Kanofsky JR, Sima P (1991) Singlet oxygen production from the reactions of ozone with biological molecules. *J Biol Chem* **266**(14): 9039-9042

Keilin D, Mann T (1940) Carbonic anhydrase. Purification and nature of the enzyme. *Biochem J* **34**(8-9): 1163-1176

Kitagawa Y, Katsube Y (1988) [Three-dimensional structure of superoxide dismutase]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* **33**(16): 2883-2888

Krinsky NI (1992) Mechanism of action of biological antioxidants. *Proc Soc Exp Biol Med* **200**(2): 248-254

Laurindo FR, da Luz PL, Uint L, Rocha TF, Jaeger RG, Lopes EA (1991) Evidence for superoxide radical-dependent coronary vasospasm after angioplasty in intact dogs. *Circulation* **83**(5): 1705-1715

Leunissen J, de Jong W, (1986) Copperzinc superoxide dismutase: how likely is gene transfer from ponyfish to *Photobacter leiognathi*? *Journal of Molecular Evolution* **23**: 250-258

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**(1): 265-275

Martin JP, Jr., Fridovich I (1981) Evidence for a natural gene transfer from the ponyfish to its bioluminescent bacterial symbiont *Photobacter leiognathi*. The close relationship between bacteriocuprein and the copper-zinc superoxide dismutase of teleost fishes. *J Biol Chem* **256**(12): 6080-6089

McCord JM, Fridovich I (1969) Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte cuprein (hemocuprein). *J Biol Chem* **244**(22): 6049-6055

Minotti G, Aust SD (1987) An investigation into the mechanism of citrate-Fe²⁺-dependent lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med* **3**(6): 379-387

Pérez-Torres E, García A, Dinamarca J, Alberdi M, Gutiérrez A, Gidekel M (2004) The role of photochemical quenching and antioxidants in photoprotection of *Deschampsia antarctica*. *Funct Plant Biol* **31**: 731-741

Perry JJ, Shin DS, Getzoff ED, Tainer JA The structural biochemistry of the superoxide dismutases. *Biochim Biophys Acta* **1804**(2): 245-262

Perry JJ, Shin DS, Getzoff ED, Tainer JA (2010) The structural biochemistry of the superoxide dismutases. *Biochim Biophys Acta* **1804**(2): 245-262

Puget K, Michelson AM (1974) Iron containing superoxide dismutases from luminous bacteria. *Biochimie* **56**(9): 1255-1267

Redl H, Gasser H, Schlag G, Marzi I (1993) Involvement of oxygen radicals in shock related cell injury. *Br Med Bull* **49**(3): 556-565

Richardson JS (1977) beta-Sheet topology and the relatedness of proteins. *Nature* **268**(5620): 495-500

Sahoo R, Kumar S, Ahuja PS (2001) Induction of a new isozyme of superoxide dismutase at low temperature in *Potentilla astrisanguinea* Lodd. variety *argyrophylla* (Wall. ex. Lehm) Griens. *Journal of Plant Physiology* **158**(8): 1093-1097

Salin ML, Bridges SM (1980) Isolation and characterization of an iron-containing superoxide dismutase from a eucaryote, *Brassica campestris*. *Arch Biochem Biophys* **201**(2): 369-374

Salin ML, Bridges SM (1982) Isolation and Characterization of an Iron-Containing Superoxide Dismutase From Water Lily, *Nuphar luteum*. *Plant Physiol* **69**(1): 161-165

Saran M, Bors W (1990) Radical reactions in vivo--an overview. *Radiat Environ Biophys* **29**(4): 249-262

Sevanian A, Hochstein P (1985) Mechanisms and consequences of lipid peroxidation in biological systems. *Annu Rev Nutr* **5**: 365-390

Shin DS, Didonato M, Barondeau DP, Hura GL, Hitomi C, Berglund JA, Getzoff ED, Cary SC, Tainer JA (2009) Superoxide dismutase from the eukaryotic thermophile *Alvinella pompejana*: structures, stability, mechanism, and insights into amyotrophic lateral sclerosis. *J Mol Biol* **385**(5): 1534-1555

Smith MW, Doolittle RF (1992) A comparison of evolutionary rates of the two major kinds of superoxide dismutase. *J Mol Evol* **34**(2): 175-184

Sorensen HP, Mortensen KK (2005) Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *J Biotechnol* **115**(2): 113-128

Steinman HM (1982) Copper-zinc superoxide dismutase from *Caulobacter crescentus* CB15. A novel bacteriocuprein form of the enzyme. *J Biol Chem* **257**(17): 10283-10293

Steinman HM (1985) Bacteriocuprein superoxide dismutases in pseudomonads. *J Bacteriol* **162**(3): 1255-1260

Tainer JA, Getzoff ED, Beem KM, Richardson JS, Richardson DC (1982) Determination and analysis of the 2 A-structure of copper, zinc superoxide dismutase. *J Mol Biol* **160**(2): 181-217

Tainer JA, Getzoff ED, Richardson JS, Richardson DC (1983) Structure and mechanism of copper, zinc superoxide dismutase. *Nature* **306**(5940): 284-287

Takahashi MA, Asada K (1983) Superoxide anion permeability of phospholipid membranes and chloroplast thylakoids. *Arch Biochem Biophys* **226**(2): 558-566

Tsumoto K, Ejima D, Kumagai I, Arakawa T (2003) Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies. *Protein Expr Purif* **28**(1): 1-8

Turrens JF, Boveris A (1980) Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochem J* **191**(2): 421-427

Wharton DA, Marshall CJ (2009) How do terrestrial Antarctic organisms survive in their harsh environment? *J Biol* **8**(4): 39

Yogavel M, Gill J, Mishra PC, Sharma A (2007) SAD phasing of a structure based on cocrystallized iodides using an in-house Cu K α X-ray source: effects of data redundancy and completeness on structure solution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **63**(Pt 8): 931-934

Yost FJ, Jr., Fridovich I (1973) An iron-containing superoxide dismutase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **248**(14): 4905-4908

Zheng Z, Jiang YH, Miao JL, Wang QF, Zhang BT, Li GY (2006) Purification and characterization of a cold-active iron superoxide dismutase from a Psychrophilic Bacterium, *Marinomonas* sp. NJ522. *Biotechnol Lett* **28**(2): 85-88

Anexo 1

Purificación por cromatografía de afinidad (Ni-NTA, Invitrogen).

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.
- Dejar asentar la resina por gravedad y cuidadosamente aspirar el sobrenadante y guardar este a 4°C.
- Lavar con el *native wash buffer* 20mM de imidazol. Dejar asentar la resina por gravedad a 4°C y aspirar el sobrenadante 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 coleccionar.

Buffers para DaSOD:

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

Native wash buffer. 50 mM NaH₂PO₄, 500 mM NaCl, 20 mM imidazol; pH 8.0

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

Native elution buffer. 50 mM NaH₂PO₄, 500 mM NaCl, 250 mM imidazol; pH 8.0

Anexo 2

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:
Para el blanco: 1ml de agua destilada
Muestras: 975 μ l de agua destilada
25 μ l de la muestra (dilución 1:40)
- Agregar 5 ml de reactivo E y dejar reposar por 10 minutos
- Agregar 500 μ l de reactivo de Folin (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.