



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTILÁN**

**CLONACIÓN Y SOBREEXPRESIÓN DEL GEN
DE LA ENZIMA BETAÍNA ALDEHÍDO
DESHIDROGENASA DE HOJA DE
Amaranthus hypochondriacus L.**

T E S I S
QUE PARA OBTENER ÉL TITULO DE
INGENIERA AGRÍCOLA
P R E S E N T A :
ELIZABETH AVILA REYES

ASESOR: Dr. ROBERTO VELASCO GARCÍA.

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

2004



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES**

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

U. N. A. 100
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES-CUAUTITLAN



DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
P R E S E N T E

DEPARTAMENTO DE
EXAMENES PROFESIONALES

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

Clonación y sobreexpresión del gen de la enzima betaina aldehído deshidrogenasa de
hoja de *Amaranthus hypochondriacus* L.

que presenta la pasante: Elizabeth Avila Reyes
con número de cuenta: 9854165-4 para obtener el título de :
Ingeniera Agrícola

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 24 de Noviembre de 2003

PRESIDENTE	Biol. Abel Bonfil Campos	
VOCAL	M. en C. Maria Magdalena Ofelia Grajales Muñiz	
SECRETARIO	Dr. Roberto Velasco García	
PRIMER SUPLENTE	M. en C. Gloria María Solares Díaz	
SEGUNDO SUPLENTE	M. en C. Juan Roberto Guerrero Agama	

NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

Agradecimientos...

**A la máxima casa de Estudios, Universidad Nacional Autónoma de México,
por las instalaciones prestadas para la realización de la presente tesis.**

*Agradezco de manera especial
el apoyo del:*

Dr. Roberto Velasco García.

**Por la dedicación brindada para la realización
de este trabajo.**

*Así como el apoyo de los siguientes
profesores:*

**Biol. Abel Bonfil Campos,
M. en C. Ma. Magdalena Ofelia Grajales Muñiz,
M. en C. Gloria María Solares Díaz,
M. en C. Juan Roberto Guerrero Agama.**

Gracias por las sugerencias y aportaciones.

*El empeño y el esfuerzo dedicado al
presente trabajo se lo debo especialmente
a mi esposo:*

Lic. en M.A. y C. Jesús Antonio Sosa Herrera.
MI TESORO MAS APRECIADO.

Dedicada a mis padres:

**Irma Reyes Jiménez y
Pablo Avila Avalos.**

A mis suegros:

**Gladys Noemi Herrera Cruz.
Jesús Antonio Sosa Martínez.**
Gracias, por su apoyo y su cariño.

M. en C. Ma. Guadalupe Sosa Herrera.
Gracias por tu amistad y apoyo.

Q.F.B Fátima Barreda Huerta.
A una gran amiga y profesionista.

A mis hijos:

Aún cuando no han nacido, prometo esforzarme cada día
en todos los aspectos para darles lo mejor, hasta
ese día...

Elizabeth Avila Reyes

	Pág.
Índice de cuadros.	4
Índice de Figuras.	5
Abreviaturas.	7
Resumen.	8
1. INTRODUCCIÓN.	9
2. GENERALIDADES.	
2.1 El Amaranto.	12
2.2 Solutos compatibles.	15
2.3 Las aldehído deshidrogenasas y la betaína aldehído deshidrogenasa.	19
3. ANTECEDENTES.	
3.1 Los genes de la BADH de hoja de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> L.	22
4. OBJETIVOS.	
4.1 Objetivo general.	24
4.2 Objetivos particulares.	24

	Pág.
5. MATERIALES Y METODOS.	
5.1 Inducción de la expresión de <i>badh</i> a bajas temperaturas y bajas concentraciones de IPTG.	25
5.2 Solubilización y diálisis para el replegamiento de la enzima BADH de hoja de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> L.	27
5.3 Aislamiento y clonación del gen <i>badh</i> que se sintetiza en hoja de amaranto bajo estrés hídrico.	28
5.3.1 Aislamiento de RNAm.	28
5.3.2 RT-PCR.	28
5.3.3 Inserción del producto de RT-PCR en el vector pCAL-n.	30
5.3.4 Transformación de <i>Escherichia coli</i> e inducción de la síntesis de la BADH.	30
5.4 Clonación y sobreexpresión del gen <i>ahybadh17</i> de amaranto en levadura.	32
5.4.1 Inserción del gen <i>ahybadh17</i> en el plásmido pRS6.	32
5.4.2 Transformación de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	33

	Pág.
6. ANALISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.	
6.1 Inducción de la expresión con el inductor IPTG.	36
6.2 Desnaturalización y diálisis para el replegamiento.	38
6.3 Obtención y clonación del gen <i>badh</i> .	40
6.4 Clonación y sobreexpresión del gen <i>ahybadh17</i> en levadura.	47
CONCLUSIONES	56
BIBLIOGRAFÍA	57
GLOSARIO	61
ANEXO	65

INDICE DE CUADROS

CUADRO	Pág.
1. Analisis bromatológico de <i>A. hypochondriacus</i> L.	14
2. Balance de aminoácidos en semillas de <i>A. hypochondriacus</i> L.	14

INDICE DE FIGURAS

FIGURA	Pág.
1. Estructura química de la glicina betaína.	17
2. Síntesis de glicina betaína.	17
3. Reacción general de las aldehído deshidrogenasas.	20
4. Reacción catalizada por la BADH.	21
5. Secuencia de aminoácidos deducidos de los genes <i>ahybadh4</i> y <i>ahybadh17</i> de hoja de <i>A. hypochondriacus</i> L.	23
6. Sobreexpresión de la BADH de amaranto inducida con IPTG en <i>E. coli</i> .	35
7. Inducción de la expresión de BADH a 18° C.	37
8. Solubilización de la proteína BADH sobreexpresada en <i>E. coli</i> .	40
9. Obtención del gen BADH de amaranto por RT-PCR.	41
10. Alineación de secuencias de aminoácidos deducida del producto RT-PCR.	43
11. Gen de amaranto obtenido por RT-PCR.	45

	Pág.
12. Plásmido pCAL-n sin digerir y digerido con NdeI.	46
13. Plásmido PBKS.	48
14. Esquema general del plásmido PRS6.	49
15. Plásmido PBKS, con el gen <i>badh</i> inserto.	50
16. Digestión de la clona PBKS – <i>ahybadh17</i> .	51
17. Vector PRS6 y gen <i>ahybadh17</i> obtenido desde PBKS.	52
18. Plásmido PRS6 sin ligar y ligado con el gen <i>ahybad17</i> .	52

ABREVIATURAS

BADH = Betaína aldehído deshidrogenasa.

badh = Gen que codifica para la enzima betaína aldehído deshidrogenasa.

CMO= Colina monooxigenasa.

DNA= Acido desoxirribonucleico.

GB= Glicina betaína.

IPTG = Isopropiltiogalactosido.

LB= Medio Luria – Bertani para cultivo de bacterias.

PCR= Reacción en cadena de la polimerasa.

RNA= Acido ribonucleico.

RNA_m = Acido ribonucleico mensajero.

RT = Transcriptasa reversa.

RT-PCR= Técnica en donde primero se lleva cabo la reacción de la transcriptasa reversa y después la reacción en cadena de la polimerasa.

SDS-PAGE = Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS.

SDS= (dodecil sulfato de sodio) Sigma.

RESUMEN

En un estudio previo los genes de la enzima betaina aldehído deshidrogenasa (BADH) de hoja de *Amaranthus hypochondriacus* L. (amaranto) y de la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* (*Pseudomonas*) fueron clonados y sobreexpresados en células de *Escherichia coli*. De las proteínas recombinantes obtenidas, sólo la de *Pseudomonas* presentó actividad, en tanto que la de amaranto se obtuvo inactiva y formando cuerpos de inclusión. En el presente trabajo se intentó, primero, obtener en forma activa a esta última proteína, sobreexpresándola en *E. coli* creciendo a bajas temperaturas e induciendo su expresión con bajas concentraciones de IPTG. En segundo lugar se buscó reactivar a la BADH inactiva, utilizando para ello tratamientos de desnaturalización con urea o cloruro de guanidina y renaturalización por diálisis. Al no tener éxito con los experimentos anteriores y considerando que el amaranto tiene por lo menos 2 genes que codifican para BADH (*ahybadh4* y *ahybadh17*), y ante la posibilidad de que no se estuviera clonando y expresando el gen que codifica para la enzima activa *in vivo*, se aisló nuevamente un gen desde la hoja de amaranto (a partir del RNAm y utilizando RT-PCR) para volver a clonarlo en *E. coli*. Como estrategia alterna se intentó la sobreexpresión en *Saccharomyces cerevisiae* (levadura). Desafortunadamente en ninguno de estos casos se logró sobreexpresar la proteína. Se discuten las causas que pudieron llevar a estos resultados y las estrategias que en un futuro podrían ser empleadas para obtener a la enzima BADH de amaranto en forma activa.

1. INTRODUCCIÓN

El crecimiento desmesurado de la población humana demanda una mayor producción de alimentos; sin embargo, las áreas destinadas al cultivo de especies vegetales comestibles se están agotando. Una posible solución a este problema radica en la utilización de tierras que hasta la fecha no han podido ser cultivadas debido a las condiciones adversas que poseen. Entre estos fenómenos que pueden afectar a la agricultura están la sequía, la erosión, o la acumulación excesiva de sales en los suelos; en ocasiones, algunos de estos problemas, son el resultado de prácticas agrícolas inadecuadas.

En particular, los fenómenos mencionados, producen una condición desfavorable para la planta, conocida como estrés osmótico, que conlleva a la pérdida de agua celular y afecta severamente la productividad. En la mayoría de los organismos, desde bacterias hasta animales, la respuesta metabólica más general hacia el estrés osmótico es la síntesis y acumulación en el citoplasma de compuestos orgánicos neutros, conocidos como solutos compatibles u osmoprotectores (Yancey, *et al* 1982). De estos compuestos, la glicina betaína (GB) es uno de los más ampliamente distribuidos en una gran variedad de familias de diferentes organismos. Entre las plantas que sintetizan y acumulan GB en respuesta al estrés osmótico, provocado por la acumulación de sales y por un déficit de agua, se encuentra la planta de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus* L.) (Rhodes y Hanson, 1993).

En las hojas de este vegetal, expuesto a un estrés hídrico, también se incrementa la actividad y los niveles de la enzima que se involucra directamente en la síntesis de GB, la betaina aldehído deshidrogenasa (BADH) (Valenzuela y Muñoz, 1994; Legaría, *et al.*, 1998).

De manera distinta, muchas de las plantas de interés agrícola no poseen la capacidad de sintetizar y acumular GB; sin embargo, considerando que este es uno de los osmoprotectores más potentes que se conocen, la síntesis de GB parece ser un punto de interés para la ingeniería genética (Walker y Gingold, 1997). Se han hecho y se siguen haciendo intentos para transformar plantas sensibles al estrés osmótico, con los genes de las enzimas involucradas en la síntesis de GB, con el objetivo de transferirles la resistencia hacia dicho estrés, sin que por el momento se haya tenido mucho éxito. Uno de los problemas más importantes con este tipo de enfoques experimentales es que se desconocen los mecanismos que regulan la actividad de estas enzimas en las plantas que las poseen de manera natural, lo que dificulta la predicción del comportamiento de dichas moléculas en las plantas transgénicas. Un paso previo a este tipo de trabajos biotecnológicos podría ser el estudio a fondo de las propiedades cinéticas y físico-químicas de dichas enzimas, para lo que es necesario contar con considerables cantidades de ellas. Una forma de conseguir esto último consiste en clonar y sobreexpresar los genes que las codifican. En el amaranto, incluso cuando la síntesis de su BADH se ha inducido por estrés osmótico, las cantidades de esta proteína son ínfimas (Rhodes y Hanson, 1993).

El lograr la clonación del gen que codifica para su BADH podría permitirnos, además de conocer las propiedades antes mencionadas, realizar mutagénesis sitio-dirigida para explorar el papel de juegan algunos aminoácidos en la actividad de dicha enzima.

2. GENERALIDADES

2.1 El amaranto.

El amaranto fue un cultivo fundamental entre las civilizaciones prehispanicas del nuevo mundo; se tienen registros de que ya existía en la región del valle de Tehuacan, México, cerca del año 4000 a. c. En la actualidad en México, el amaranto constituye uno de los cultivos básicos en la alimentación, junto con el maíz, el frijol, la calabaza y los chiles de diferentes especies. El género *Amaranthus* pertenece a la familia *Amaranthaceae*, y está compuesto por 50 especies; sin embargo, el número de especies con semilla comestible se reduce a tres: *Amaranthus hypochondriacus*, *Amaranthus caudatus* y *Amaranthus cruentus* (Flores, 1994).

De las tres especies anteriores, solo *Amaranthus cruentus* y *Amaranthus hypochondriacus* se cultivan en México, mientras que *Amaranthus caudatus* se cultiva en Sudamérica (Trinidad y Gómez, 1986). El amaranto es una planta herbácea, anual, de 1.5 a 2 m de altura; su tallo es ramificado desde la base y marcado con estrías longitudinales; sus hojas largamente pecioladas y ovaladas, miden aproximadamente 15 cm de largo y 10 cm de ancho; posee inflorescencias en panículas terminales o axilares, muy ramificadas, de aproximadamente 50 cm de largo. Sus flores son de color rojo o púrpura, de 4 a 5 mm. En la misma panícula se encuentran los órganos vegetativos femenino y masculino. El fruto es una cápsula pequeña, que se abre transversalmente y contiene una sola semilla blanca, lisa y brillante, ligeramente aplanada (Alejandre y Gómez 1999).

Una de las características más importantes del amaranto es, su alto valor nutritivo (Ver Cuadro 1). El amaranto se puede aprovechar de múltiples formas: como grano, como verdura o como forraje. Es también un cultivo altamente eficiente que puede prosperar en condiciones agroclimáticas adversas, tales como sequía, altas temperaturas y suelos salinos.

La semilla presenta una gran versatilidad, pudiéndose utilizar en la preparación de diversos alimentos el cual se considera un prometedor potencial de aplicación industrial, tanto en la industria de los alimentos como en la elaboración de cosméticos, colorantes y hasta plásticos biodegradables (Flores, 1994). Diversos autores han reportado contenidos de proteína en amaranto que van de 15 a 17%, pero su importancia no sólo radica en la cantidad, sino también en la calidad de la proteína, ya que presenta un excelente balance de aminoácidos (Cuadro 2). La composición de la proteína del amaranto se asemeja a la de la leche y se acerca mucho a la proteína ideal propuesta por la FAO para la alimentación humana (Flores, 1994). Resulta interesante destacar su contenido en lisina, aminoácido esencial en la alimentación humana y que comúnmente es limitado en otros cereales. Referente a su contenido de lípidos, este va de 7 a 8%. Estudios recientes han encontrado un contenido relativamente alto de escualeno (aproximadamente 8% del aceite de la semilla). El escualeno es un excelente aceite para la piel, lubricante y precursor del colesterol, que comúnmente se obtiene de animales como la ballena y el tiburón (Alejandre y Gómez 1999).

CARBOHIDRATOS ASIMILABLES	50- 60 %
Proteínas	14- 16 %
Extracto etéreo	6.50 %
Fibra cruda	15.70 %
Cenizas	2.70 %
Humedad	10.25 %

Cuadro 1 Analisis bromatológico de *Amaranthus hypochondriacus* L.
(Alejandre y Gómez 1999).

	Treoni- na.	Valina	Leucina	Isoleuci- na.	Lisina	Metioni- na	Fenilala- nina	Triptófa- no	Contenido de proteína
Proteina ideal	11. 1	13. 9	19. 4	11. 1	15. 5	9. 7	16. 7	2. 8	100. 0
Trigo entero	8. 9	13. 5	20. 4	10. 0	8. 7	12. 3	22. 9	3. 3	56. 9
Soya	9. 8	12. 2	19. 8	11. 6	16. 2	6. 6	20. 6	3. 3	68. 0
Leche de vaca	9. 4	12. 3	20. 2	10. 0	16. 5	7. 0	21. 5	3. 0	72. 2
Amaranto	11. 4	10. 6	14. 8	10. 2	16. 6	11. 2	23. 1	2. 1	75. 0

Cuadro 2 Balance de aminoácidos en semillas de *Amaranthus hypochondriacus* L. % de aminoácidos esenciales con respecto al total de aminoácidos (Flores, 1994).

El valor nutritivo de las hojas de amaranto también ha sido ampliamente estudiado. Se ha encontrado que la hoja contiene altos valores de calcio, hierro, fósforo y magnesio, así como de ácido ascórbico, vitamina A y de fibra (Flores, 1994). Estudios bioquímicos realizados sobre el amaranto, apoyan la idea de ser una planta eficiente en su proceso fotosintético, ya que es una planta C4, mecanismo de fijación de carbono que supera en eficiencia al resto de las plantas CAM y C3. Las plantas con ruta C4 crecen, en general, más rápidamente y responden bajo condiciones ambientales adversas, hacen un uso más eficiente del agua consumida, en comparación con las plantas C3. (National Research Council, 1984).

El amaranto es un cultivo de ciclo corto, tolerante a la sequía. Se considera como un cultivo de alternativa para muchos lugares donde hay escasez e irregularidad de lluvias y donde incluso, se presentan problemas de abasto de alimentos que dañan la salud poblacional (Trinidad y Gómez, 1986).

2.2 Solutos compatibles.

El término de solutos compatibles fue introducido por Borowitzka y Brown en 1974, para describir a aquellas sustancias que se acumulan cuando la planta está sometida a bajos potenciales de agua y que no son inhibitorias del metabolismo, (Borowitzka y Brown, 1974).

Los solutos compatibles evitan la deshidratación celular al igualar el potencial osmótico del citoplasma con el del medio externo (Arakawa y Timasheff, 1985). Son moléculas no cargadas o zwitteriónicas, entre los que encontramos a algunos aminoácidos, como la prolina, azúcares como la sacarosa, polialcoholes como el sorbitol o el glicerol, y aminas cuaternarias como la glicina betaina. A nivel celular, se ha propuesto que estos compuestos son excluidos de la superficie de las proteínas y de su esfera inmediata de hidratación, favoreciendo así la conformación nativa de las proteínas (Rhodes, 1987).

Entre las funciones que ejercen los solutos compatibles se han mencionado las siguientes:

- 1) Elevan la temperatura de desnaturalización de las proteínas globulares.
- 2) Favorecen las interacciones entre las subunidades de las proteínas.
- 3) Evitan la inhibición de las actividades enzimáticas causada por sales inorgánicas.
- 4) Estabilizan a las membranas o las proteínas unidas a ellas.
- 5) Protegen a las proteínas de los efectos nocivos provocados por las bajas temperaturas.

En plantas angiospermas, los compuestos de amonio cuaternario juegan un papel importante como solutos compatibles. De estos compuestos, la glicina betaina (GB) (Fig. 1) es el más ampliamente distribuido, presentándose en una amplia variedad de familias vegetales (Rhodes y Hanson, 1993).

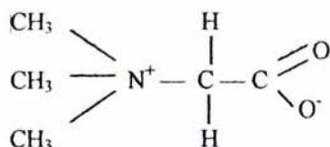


Figura 1 Estructura química de la glicina betaína.

Se ha reportado que la GB se acumula en *Suaeda maritima*, *Beta maritima* y algunas especies del genero *Spartina*, todas ellas plantas halófilas (Wyn y Storey, 1981). Entre las no halófilas que también acumulan este compuesto como respuesta hacia el estrés osmótico se encuentran la espinaca, la cebada, el trigo, el sorgo y el amaranto (Hanson y Hitz 1982). La síntesis de GB se lleva acabo en el cloroplasto a partir de colina en dos pasos de deshidrogenación catalizados por la colina monooxigenasa (CMO), teniendo como intermediario a la betaína aldehído (BA). La enzima betaína aldehído deshidrogenasa (BADH) cataliza el último paso en la síntesis de GB y pertenece a la familia de las aldehído deshidrogenasas.



Figura 2 Síntesis de GB.

Se ha encontrado que en hojas de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) expuesto a un estrés hídrico, se produjo un incremento en la actividad de BADH (Valenzuela y Muñoz, 1994), así como en los niveles de RNAm y en la síntesis de proteína de esta enzima (Legaría, *et al.*, 1998), lo que apoya su participación en la respuesta de la planta hacia este tipo de estrés.

Muchas de las plantas de interés agrícola no poseen la capacidad de sintetizar y acumular GB; sin embargo, considerando que este es uno de los osmoprotectores más potentes que se conocen, la síntesis de GB parece ser un punto de interés para la ingeniería genética (Walker y Gingold, 1997). Se han hecho y se siguen haciendo intentos para transformar plantas sensibles al estrés osmótico, con los genes de las enzimas involucradas en la síntesis de GB, con el objetivo de transferirles la resistencia hacia dicho estrés, sin que por el momento se haya tenido mucho éxito.

Uno de los problemas más importantes con este tipo de enfoques experimentales es el desconocimiento de los mecanismos que regulan la actividad de estas enzimas en las plantas que las poseen de manera natural, lo que dificulta la predicción del comportamiento de dichas moléculas en las plantas transgénicas. Un paso previo a este tipo de trabajos biotecnológicos podría ser el estudio a fondo de las propiedades cinéticas y fisico-químicas de dichas enzimas, para lo que es necesario contar con considerables cantidades de ellas. Una forma de conseguir esto último consiste en clonar y sobreexpresar los genes que las codifican.

En el amaranto, incluso cuando la síntesis de su BADH se ha inducido por estrés osmótico las cantidades de esta proteína son ínfimas (Rhodes y Hanson, 1993). El lograr la clonación del gen que codifica para su BADH podría permitir además, en un futuro, realizar mutagénesis sitio- dirigida, para así explorar el papel que juegan algunos aminoácidos en la actividad de dicha enzima. Esta planta constituye por tanto, un modelo interesante para el estudio de las bases moleculares de la respuesta de las plantas a estrés osmótico, pudiendo además tener importantes aplicaciones biotecnológicas en un futuro.

2.3 Las aldehído deshidrogenasas y la betaína aldehído deshidrogenasa.

Los aldehídos son compuestos ampliamente distribuidos en la naturaleza, pudiéndoseles encontrar en las frutas, en los vegetales y en el humo del cigarro. *In vivo*, la mayoría de ellos se presentan como intermediarios en el metabolismo de otros compuestos, y la mayoría tienen efectos negativos, incluyendo citotoxicidad, mutagenicidad, genotoxicidad y carcinogenicidad (Lindhal, 1992). Debido a esto, es importante la eliminación selectiva de los aldehídos en los sistemas biológicos para evitar sus efectos deletéreos. Entre las formas más efectivas de eliminación de estos compuestos está su oxidación irreversible hasta ácidos carboxílicos, por acción de las aldehído deshidrogenasas (ALDHs) que se encuentran distribuidas desde las bacterias hasta los mamíferos. La variedad de sustratos que aceptan las ALDHs incluye no solo aldehídos alifáticos y aromáticos, sino también aldehídos 2-halogenados, 2-hidroxi y 2-enoico.

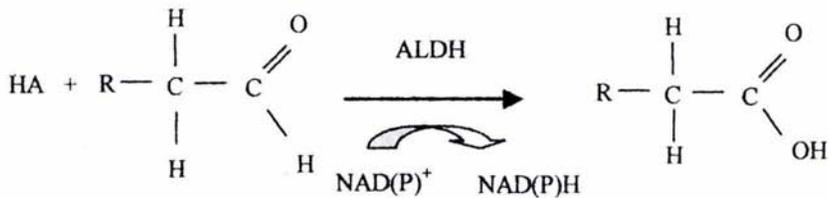


Figura 3 Reacción general de las aldehído deshidrogenasas.

Según (Jakoby, 1963) las enzimas ALDH se clasifican en diferentes categorías de acuerdo a ciertos criterios:

Clase I: el agua participa como reactante en la reacción de catálisis, por lo que "A", en la reacción anterior es OH.

Clase II: Cuando la letra "A" en la reacción anterior es un fosfato, un arsenato, o un mercaptano.

Clase III: Combinación de los dos tipos anteriores.

Otro criterio de clasificación se refiere a su compartimentalización celular, en donde:

Clase I (citosólicas), Clase II (mitocondriales), Clase III (microsomales y tumorales).

Ciertas ALDH requieren de un sustrato específico, entre las que encontramos a la betaína aldehído deshidrogenasa. Esta enzima, como ya se mencionó en párrafos anteriores, es trascendental en la adaptación de los organismos al estrés osmótico y pertenece a la familia de las ALDH clase I (en las que el agua participa como reactante en la reacción de catálisis).

A pesar del conocimiento que actualmente se tiene de esta enzima, existen muchas otras de sus características que solamente se podrán conocer si se logra la clonación de su gen. Se podría, por un lado, manipularla a través de mutagénesis sitio-específico, y por otro, realizar su cristalización para conocer su estructura tridimensional real.

3. ANTECEDENTES

3.1 Los genes de la BADH de hoja de *Amaranthus hypochondriacus* L.

Se ha reportado que el genoma de *Amaranthus hypochondriacus* L. posee al menos dos genes para BADH: *ahybadh4*, aislado como DNA genómico (con exones e intrones), y *ahybadh17*, obtenido como cDNA (Legaría *et al.*, 1998). El gen *ahybadh17* codifica para una proteína de 500 aminoácidos, cuya secuencia muestra una identidad del 98% con la de la proteína (de 501 aminoácidos) que es codificada por *ahybadh4* (ver Fig. 5).

```

1
ahybadh4 MAIRVPSRQLFIDGEWREPIKKNRIPI INPSTEEI IGDIPAATAEDVELAVAAARRALKR
ahybadh17 MAIRVPSRQLFIDGEWREPIKKNRIPI INPSTEEI IGVIPAATAEDVELAVAAARRALKR
*****

61
ahybadh4 NKGEDWASASGAHRAKYLRAIAAKITEKKDYFAKLEAMDCGKPLDEAARDIDDVAGCFEY
ahybadh17 NKGEDWASASGAHRAKYLRAIAAKITEKKDYFAKLEAMDCGKPLDEAAWDIDDVAGCFEY
*****

121
ahybadh4 YADQAEALDAKQKAPIALPMDTFKCHVLKQPIGVVGLISPWNYP LLMATWKVAPALAAGC
ahybadh17 YADQAEALDAKQKAPIALPMDTFKCHVLKQPIGVVGLISPWNYP LLMATWKVAPALAAGC
*****

181
ahybadh4 SAVLKPSELASVTCLELAEVCREVGLPPGVLNILTGLGPEAGGPLACHPDVDKVAFTGST
ahybadh17 SAVLKPSELASVTCLELAEVCREVGLPPGVLNILTGLGPEAGGPLACHPDVDKVAFTGST
*****

```

```

241
ahybadh4 ATGSKVMSSAAQLVKPVTLELGGKSPIVIFEDVDLDKAAEWTAFGCFWTNGQICSATSRL
ahybadh17 ATGSKVMSSAAQLVKPVTLELGGKSPIVIFEDVDLDKAAEWTAFGCFWTNGQICSATSRL
*****

301
ahybadh4 LVHESIAAEFLDRLVKWKCKNIKISDPFEEGCR LGPVVSKSQYEKVLKFI STAKSEGATIL
ahybadh17 LVHESIAAEFLDRLVKWKCKNIKISDPFEEGCR LGPVVSKSQYEKVLKFI STAKSEGATIL
*****

361
ahybadh4 CGGSRPEHLKKGYYVEPTISSDVSTSMQIWREEVFGPVLCQKTFGSEDEAIELANDTQYG
ahybadh17 CGGSRPEHLKKGYYVEPTISSDVSTSMQIWREEVFGPVLCVKTFGSEDEAIELANDTQYG
*****

421
ahybadh4 LGAAVLSKDLDR CERITKALEVGAVVWVNCSPCFTQAPWGGTKRSGFGRELGEWGIENYL
ahybadh17 LGAAVLSKDLDR CERITKALQAGAVVWVNCSPCF CQAPWGGTKRSGFGRELGEWGIENYL
*****

481
ahybadh4 NIKQVTRDTSTDEPWGWYKSP
ahybadh17 NIKQVTEYIS-DEPWGWYKSP
***** * *****

```

Figura 5 Secuencia de aminoácidos de los genes *ahybadh4* y *ahybadh17* de hoja de *A. hypochondriacus* L.. Las diferencias entre ambas se indican por la ausencia de asteriscos.

En el laboratorio en donde se realizó el presente trabajo, recientemente se logró clonar el gen de la BADH de la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* y el *ahybadh17* de amaranto (resultados no publicados). Ambos genes fueron luego sobreexpresados en células de *Escherichia coli*, encontrando con actividad únicamente a la enzima de *Pseudomonas aeruginosa*. En el caso de la BADH de amaranto, aunque sé sobreexpresó, la enzima formó cuerpos de inclusión (agregados proteicos insolubles), resultando inactiva. Considerando estos antecedentes, en el presente trabajo se propusieron los siguientes objetivos:

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

1. Buscar la sobreexpresión en forma activa del gen de la enzima BADH *Amaranthus hypochondriacus* L.

Para intentar lograr esto se abordaron los siguientes objetivos, en el orden en que se mencionan:

4.2 Objetivos particulares

1. Expresar esta enzima a temperaturas menores (30 y 18 °C) a la que crece óptimamente *E. coli* (37 °C).
2. Inducir esta expresión utilizando bajas concentraciones del inductor (IPTG).
3. Intentar reactivar la enzima sobreexpresada en forma inactiva, desnaturalizándola con urea o cloruro de guanidina y tratando de renaturalizarla por diálisis.
4. Aislar y clonar nuevamente el gen *badh* que se expresa en hojas de amaranto sometidas a un estrés hídrico.
5. Clonar el gen *badh* de hoja de amaranto en un vector que permita la sobreexpresión de BADH en levadura.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en el laboratorio de osmorregulación de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM bajo la dirección del Dr. Roberto Velasco García.

5.1 Inducción de la expresión de *badh* a bajas temperaturas y bajas concentraciones de IPTG.

Células *E. coli* de la cepa BL21(DE3)pLysS, transformadas previamente con el plásmido vector pCAL-n (Stratagene), teniendo inserto el gen *ahybadh17* de amaranto, se mantuvieron en crecimiento a 37°C toda la noche en medio LB líquido (con 50 µg de ampicilina/ml), para después resembrar 75 µl del cultivo en 10 tubos conteniendo cada uno 3 ml de LB con ampicilina. Después de 1 1/2 h de haber resembrado, y con una turbidez de los cultivos de 0.6 unidades de absorbancia, los tubos se dividieron en dos grupos de 5 tubos cada uno, para incubarse por separado a 30 °C y 18 °C. Al mismo tiempo a 4 de los 5 tubos se les agregó IPTG hasta una concentración final de 100 µM, para inducir la síntesis de BADH. El quinto tubo de cada grupo se incubó en su respectiva temperatura en ausencia de IPTG. A las 3, 6, 9 y 28 h después de haberse iniciado la inducción, un tubo de cada temperatura (30 y 18 °C) fue retirado para desintegrar las células por sonicación y medir la actividad de BADH por espectrofotometría. El control sin IPTG fue procesado hasta las 28 de incubación.

Para la sonicación se utilizó un sonicador Branson a 25 watts durante 15 s y una temperatura de 4 °C. El homogeneizado se centrifugó después a 10,000 rpm. durante 10 minutos. Cinco μl de cada sobrenadante (extracto celular) se utilizaron para medir la actividad de la BADH, siguiendo el incremento en absorbencia (la formación de NADH) a 340 nm, en la siguiente mezcla de reacción: HEPES-KOH 100 mM, pH 8.0, EDTA 1 mM, BA 0.5 mM y NAD^+ 1.0 mM. La temperatura en el medio de reacción fue de 30°C.

Al mismo tiempo en que se midió la actividad, 25 μL de cada cultivo fueron mezclados con el mismo volumen de la solución de muestra 2X con SDS (Laemmli, 1970) y almacenados a -20°C. Al término de la incubación de los cultivos a 30 y 18°C, se descongelaron las muestras previamente almacenadas a -20°C y después se calentaron en baño María a 96°C durante 5 min; se separaron 20 μl de cada una de ellas por electroforesis en geles de poliacrilamida al 9% con SDS (Laemmli, 1970), utilizando una cámara Miniprotean II (Bio-Rad). Al final se tiñeron con azul de Coomassie R-250.

También se llevó a cabo un experimento similar al anterior, pero con una temperatura de 37°C en el baño de incubación de las células e induciendo la sobreexpresión con 1 y 10 μM de IPTG.

Los tiempos para medir la actividad de la enzima y separar sus proteínas fueron 1.5, 3.0 y 5.0 h, después de haber agregado el IPTG.

5.2 Solubilización y diálisis para el replegamiento de la enzima BADH.

Las células de un cultivo de *E. coli* BL21(DE3)pLysS, creciendo durante 3 h en 800 mL de LB con IPTG 100 μ M y a 37 $^{\circ}$ C para inducir la síntesis de BADH, fueron centrifugadas a 4,000 rpm durante 20 min. El precipitado fue resuspendido en 56 mL de amortiguador de extracción (Hepes-KOH 50 mM, pH 7.4, glicerol 5% (v/v), DTT 2 mM y EDTA 1 mM) para después sonicar a 60 watts y con una temperatura de 4 $^{\circ}$ C, utilizando dos ciclos de sonicación de 30 s y dos de 15 s, con 1 minuto de descanso entre cada uno de ellos. El homogeneizado se centrifugó después a 10,000 rpm. durante 20 min, resuspendiendo el precipitado en 40 ml de amortiguador de extracción. Esta resuspensión, que contenía los cuerpos de inclusión de BADH, fue dividida en 4 partes iguales de aproximadamente 10 ml cada una, para aplicarles los siguientes tratamientos: I= urea 2 M, II= urea 6 M, III= cloruro de guanidina 4 M y IV= cloruro de guanidina 4 M con tritón X-100 5%. Estas muestras fueron mantenidas durante 12 h a 4 $^{\circ}$ C, y centrifugadas nuevamente a 10,000 rpm. por 20 min. Parte de los sobrenadantes y precipitados fueron analizados en un gel de poliacrilamida al 9%, para conocer el grado de solubilización de la BADH recombinante. Cinco ml de cada uno de los sobrenadantes fueron dializados a lo largo de 12 h (por separado) contra 500 ml cada uno, del amortiguador de extracción (en dos ocasiones). La actividad de BADH presente en cada uno de los dializados fue ensayada en la forma en que se describe en la sección anterior.

5.3 Aislamiento y clonación del gen *badh* que se sintetiza en hoja de amaranto bajo estrés hídrico.

5.3.1. Aislamiento del RNAm.

Hojas de plantas de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus* L.) de aproximadamente 6 semanas de edad, fueron cortadas y sus peciolo sumergidos durante 4 h en una solución de PEG 6000 al 17.2% (p/v), equivalente a un potencial hídrico de -1.0 Mpa. (Valenzuela y Muñoz, 1994). Estas hojas fueron almacenadas a -80 °C para su posterior utilización.

Para el aislamiento del RNAm, 200 mg del tejido foliar procesado como se describió antes, fueron cortados en pequeños trozos, congelados con nitrógeno líquido y procesados de acuerdo al método del Kit Micro-FastTrack 2.0 de Invitrogen (life technologies). Este método se basa en la utilización de celulosa dT para separar los RNAm poli A⁺.

5.3.2 RT-PCR.

A partir del RNAm obtenido, se sintetizó el DNAc y se amplificó el DNA para obtener el gen *badh* de doble cadena. Estos dos procesos se realizaron en un mismo tubo utilizando el Kit "SuperScript one Step RT-PCR with Platinum *Taq*", de Invitrogen (life technologies), que involucra la reacción de la enzima transcriptasa reversa (RT) SuperScript II y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de DNA, *Taq*.

En la reacción de RT-PCR también se tuvieron los siguientes oligonucleótidos cebadores (primers), específicos para el gen *badh*, a una concentración final de 200 nM.

BADHam1

5' GGA ATT CCA T ATG GCG ATC CGT GTA CCT TCG C 3'

BADHam2

5' GGA ATT C TCA AGG AGA CTT GTA CCA TCC CC 3'

Las partes subrayadas son los sitios de corte para las enzimas *Nde* I (en BADHPam1) y para *Eco* RI (en BADHam2). La síntesis de estos nucleótidos fue realizada por GIBCO BRL, de Life Technologies. La síntesis del DNAc se realizó a 50 °C, durante 30 min. El número de ciclos para la PCR fue de 40, con una fase de desnaturalización de 30s a 94 °C, una de alineamiento de 30 s a 60 °C y otra de extensión durante 2 min a 70 °C. Después de los 40 ciclos se le dio un ciclo de extensión final de 10 min a 72 °C.

Para verificar que en la preparación del RNAm estaba ausente el DNA genómico, se utilizó un control en el mismo experimento de RT-PCR en el que únicamente se agregó la polimerasa *Taq*, pero no la enzima transcriptasa reversa SuperScript II. El producto de la amplificación fue verificado separándola por electroforesis en un gel de agarosa al 1% (p/v) y tiñendo con bromuro de etidio (0.2 µg/ml). Este mismo tipo de gel, junto con el marcador de DNA de 1 Kb (Gibco BRL, Life Technologies), se utilizó en todos los experimentos cuyo objetivo era separar algún fragmento de DNA o conocer su tamaño.

La banda con el tamaño esperado (1500 pb), separada por electroforesis en gel de agarosa, fue purificada con el sistema Gene Clean (BIO 101), siguiendo las instrucciones del proveedor, y secuenciada en un secuenciador Genetic analyzer, Modelo 3100, del laboratorio de Análisis y Química de ADN de la F. E. S. Iztacala, U. N. A. M.

5. 3. 3 Inserción del producto de RT-PCR en el vector pCAL-n.

Se digirieron el producto de RT-PCR y el vector pCAL-n (Stratagene) (aproximadamente 3 µg de c/u), durante 18 h (37 °C) con la enzima *Nde* I (Gibco BRL, Life Technologies). Los productos de la digestión fueron separados por electroforesis en gel de agarosa y purificados con el sistema Gene Clean. Después se procedió a cortarlos por 5 h (37 °C) con la enzima *Eco*R I (Gibco BRL, Life Technologies) y a defosforilar el vector durante 1 h (37 °C). Se limpiaron los productos de la digestión tratándolos con fenol y luego se ligaron entre sí (2 h a 37 °C) con la DNA ligasa T4 (Gibco BRL, Life Technologies) en presencia de 1 mM de ATP. Para ello se utilizaron las siguientes proporciones molares de inserto/vector: 1/1, 2/1 y 3/1.

5. 3. 4 Transformación de *E. coli* e inducción de la síntesis de la BADH.

Se colocaron 100 µl de la cepa de *E. coli* XL1-Blue competente (Stratagene), junto con 10 µl de cada una de las mezclas utilizadas para la reacción de la DNA ligasa, en tubos Eppendorf de 1.5 ml preenfriados en hielo.

Se mantuvieron todos los tubos durante 30 min en hielo para posteriormente colocarlos durante 23 segundos a 42 °C, agregando inmediatamente después 0.9 ml de medio LB a cada uno de ellos.

Se incubaron los tubos a 37 °C durante 1 h con una agitación de 250 r.p.m. y 100 µl de cada uno se esparcieron en cajas de Petri conteniendo LB con carbenicilina (50 µg/ml). Los 0.9 ml restantes de cada tubo se centrifugaron a 3000 X g durante 5 min y el precipitado se resuspendió en 100 µl de LB para después esparcirlos en cajas con LB y carbenicilina. Se incubó a 37°C durante toda la noche.

Las 3 proporciones de inserto/vector presentaron 9 colonias, de las que 3 fueron seleccionadas para purificar su DNA plasmidal (Sambrook *et al.*, 1980). Estas muestras de DNA se utilizaron para transformar *E. coli* BL21(DE3)pLysS (Stratagene) de la manera que se describió para la cepa XL1-Blue.

Las células BL21(DE3)pLysS transformadas fueron cultivadas a 37°C toda la noche en medio LB líquido (con 50 µg de carbenicilina/ml), para después resembrar 75 µl de cada uno de los cultivos en 3 ml de LB con carbenicilina. Después de 1 1/2 h de haber resembrado, y con una turbidez de los cultivos de 0.6 unidades de absorbencia, se tomaron 25 µl de cada uno de ellos para mezclarlos con el mismo volumen de la solución de muestra 2X con SDS (Laemmli, 1970) y guardarlos a -20°C (control sin inducción); al mismo tiempo se agregó IPTG a cada tubo hasta una concentración final de 1 mM para inducir la síntesis de BADH.

A las 3 h después de haberse iniciado la inducción se procesó la muestra medir la actividad de BADH, como se describe en la primer sección de materiales y métodos; al mismo tiempo se procesaron 25 µl de cada cultivo para separar sus proteínas por electroforesis en geles de poliacrilamida como también se describe en la sección antes mencionada.

5.4 Clonación y sobreexpresión del gen *ahybadh17* de amaranto en levadura.

5.4.1 Inserción del gen *ahybadh17* en el plásmido pRS6.

Para este experimento, el gen del cual se partió fue el *ahybadh17* de amaranto inserto en el plásmido PBKS (PBKS-*ahybadh17*), que fue donado por el Dr. Gabriel Iturriaga De la Fuente, del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Éste y el vector pRS6 (aproximadamente 3 µg de c/u), fueron digeridos durante 16h (a 37 °C) con la enzima *Not I* (BioLabs). Los productos de la digestión fueron separados por electroforesis en gel de agarosa y purificados con el sistema Gene Clean, como ya se describió arriba. La digestión de pRS6 con la segunda enzima (*Sal I*, de BioLabs) se llevó a cabo durante 1h a 37 °C, procediendo después a desfosforilarlo. Para la digestión de PBKS-*ahybadh17*, en cambio, tuvo que hacerse primero una curva del grado de digestión contra tiempo, para intentar obtener el máximo rendimiento del gen intacto; previamente se había determinado que el gen *ahybadh17* tiene un sitio de corte interno par *Sal I*.

El tiempo de corte seleccionado con *Sal I* fue de 4 min. Se limpiaron los productos de la digestión, tratándolos con fenol (Sambrook *et al.*, 1980), y luego se ligaron entre sí (2 h a 37 °C) con la DNA ligasa T4 (Gibco BRL, Life Technologies) en presencia de 1 mM de ATP. Para ello se utilizaron las siguientes proporciones molares de inserto/vector: 1/1, 2/1 y 3/1. Con la finalidad de contar con una mayor cantidad del producto de ligación (PRS6-*ahybadh17*), primero se transformó con las 3 mezclas de ligación mencionadas la cepa BL21(DE3)pLysS de *E. coli*. Tres de las transformantes obtenidas fueron seleccionadas para purificar su DNA plasmidal, y el DNA obtenido, utilizado para transformar células de levadura.

5.4.2 Transformación de *Saccharomyces cerevisiae*.

Células de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) con auxotrofia por el aminoácido histidina (His⁻), se mantuvieron en crecimiento durante 20 h en 3 ml de medio YEPD (extracto de levadura 1%, peptona 2% y glucosa 2%) a 30 °C y con agitación orbital. El cultivo se centrifugó a 5000 r. p. m. durante 10 min y las células se resuspendieron en 1 ml de agua bidestilada estéril, para después transferirlas a un tubo Eppendorf de 1.6 ml. Luego de centrifugar 10 s a 14,000 r. p. m., se retiró el sobrenadante y las células se resuspendieron en 100 µl de agua bidestilada estéril.

20 μ l de esta resuspensión fueron mezclados con 10 μ L del DNA plasmidal (500 ng) purificado desde BL21(DE3)pLysS y 100 μ l de solución "one step" (acetato de litio 0.2 M, PEG 3350 al 40% (p/v) y ditioneitol 100 mM). Después de incubar esta mezcla durante 30 min a 44 °C, se le agregó 1 ml de agua estéril y se centrifugó 10 s a 14,000 r. p. m. Se incluyeron dos controles durante la transformación de levadura: (i) con el plásmido PRS6 intacto (sin digestión alguna), y (ii) con PRS6 digerido con *Not I* y *Sal I*.

Para la selección de las células transformadas, el precipitado obtenido después de la centrifugación anterior, fue resuspendido en 100 μ l de agua estéril y se extendió sobre una placa de agar conteniendo medio SD libre de His, que contenía: base de nitrógeno libre de aminoácidos al 0.67%, glucosa al 2%, leucina (30 μ g/ml⁻¹), adenina (40 μ g/ml⁻¹), uracilo (20 μ g/ml⁻¹) y triptofano (30 μ g/ml⁻¹). Las placas fueron incubadas durante 48 h a 30 °C. Dos colonias de levadura transformadas con el DNA plasmidal obtenido desde BL21(DE3)pLysS, y que crecieron placas con medio SD libre de His, fueron transferidas a medio SD libre de His líquido, y crecidas a 30 °C durante 20 h. Las células fueron luego procesadas para medir la actividad de BADH y para separar sus proteínas por electroforesis en geles de poliacrilamida, como se describe en la primer sección de materiales y métodos.

6. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

En el laboratorio en el que se realizó el presente trabajo, previamente se logró clonar el gen *badh* de amaranto y sobreexpresar la proteína BADH en la bacteria *E. coli*. La proteína obtenida, no presentó actividad. Este resultado parece deberse a que la proteína que se está sintetizando tiene un plegamiento anómalo, lo que la lleva a agregarse de una manera anormal, formando cuerpos de inclusión insolubles. En la Fig. 6 se observa que después de haber centrifugado el extracto de *E. coli*, en donde se encuentra la proteína recién sobreexpresada (con 55 kDa de masa molecular), durante 10 min y con una fuerza de 10,000 r. p. m., esta se precipita, formando seguramente cuerpos de inclusión.

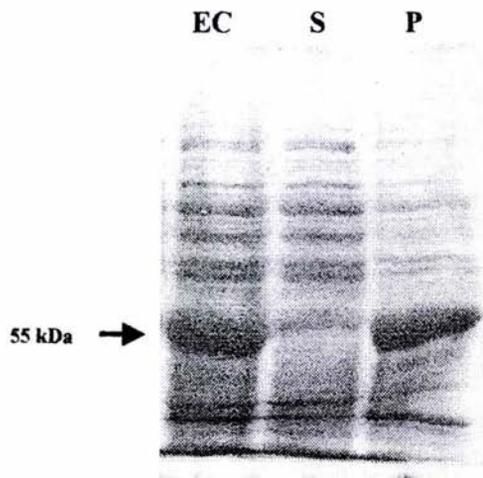


Figura 6 Sobreexpresión de la BADH de amaranto inducida con IPTG en *E. coli* BL21(DE3)pLysS transformada con pCALn-*badh*. EC= proteínas totales obtenidas del extracto celular. S= proteínas obtenidas en el sobrenadante después de centrifugar el extracto celular. P= proteínas del precipitado obtenido. Las proteínas fueron separadas en geles de poliacrilamida al 9% con SDS.

6.1 Inducción de la expresión con el inductor IPTG.

El problema de la agregación de proteínas durante la expresión heteróloga de genes foráneos es frecuente, sobretodo en *E. coli*, por ser la bacteria más utilizada para dichos fines (Delves *et al.*, 1993; López *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2002). Una estrategia que se ha utilizado para evitar la formación de cuerpos de inclusión consiste en inducir la sobreexpresión a bajas temperaturas (Vierstra, 1993). Se considera que el cambio en la temperatura, que llevo a una disminución en la velocidad del crecimiento bacteriano, y por ende también en la de la síntesis proteica, podría también resultar en un mejor plegamiento de la(s) proteína(s) que se está(n) sobreexpresando. Considerando esto, en el presente estudio se decidió realizar la inducción con IPTG 100 μ M, creciendo a la bacteria a 30 y 18 °C, tomando en cuenta que la expresión anterior se había realizado a 37°C (Fig. 6), que es la temperatura óptima para el crecimiento de *E. coli*. En la Fig. 7 se presentan únicamente los resultados de la inducción a 18°C, considerando que a 30°C los resultados encontrados fueron similares.

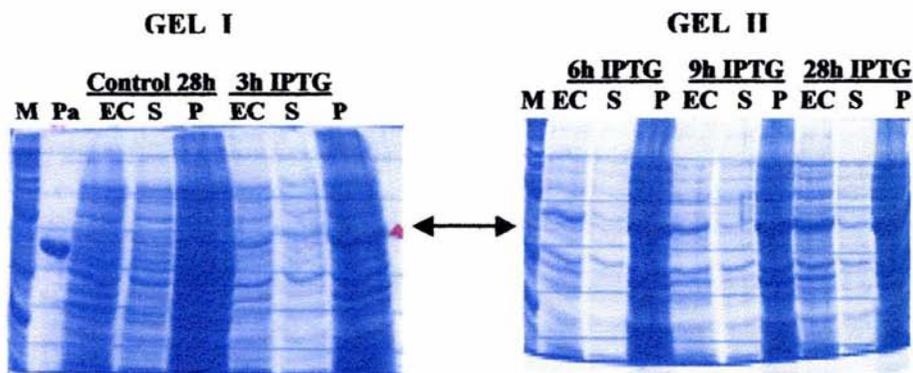


Figura 7 Inducción de la expresión de BADH a 18°C. La bacteria *E. coli* BL21(DE3)pLysS previamente transformada con el vector pCALn-*badh*, se mantuvo en crecimiento a 18 °C en presencia de IPTG (100 mM) durante los tiempos que se indican. En el gel I se muestran los patrones proteicos de la bacteria creciendo durante 28h en ausencia de IPTG. S= proteínas obtenidas en el sobrenadante después de centrifugar el extracto celular. P= proteínas del precipitado obtenido. M= marcadores de PM. Pa= BADH purificada desde *P. aeruginosa*. Las proteínas fueron separadas en geles de poliacrilamida al 9% con SDS.

El crecimiento de la bacteria a 18°C fue más lento que a 37°C, por lo que el seguimiento de la sobreexpresión tuvo que hacerse durante un período más largo (hasta 28h, cuando comúnmente se hace en 6h, como máximo). La expresión de BADH se hizo evidente en los extractos celulares 3h después de haber agregado el IPTG al cultivo, pero el máximo parece alcanzarse a las 9h. Con relación a la actividad, ésta no se pudo detectar en ninguna de las muestras obtenidas en los distintos tiempos en que se indujo la síntesis. Lo anterior se relaciona con insolubilidad de la proteína BADH, pues aparece en los precipitados de todas las muestras, pero no en los sobrenadantes (P en la Fig. 7).

A la par del experimento anterior, y teniendo también como objetivo el sobreexpresar a la enzima en forma activa, se decidió bajar la concentración del inductor (IPTG) de 100 a 10 y 1 μM . Los resultados obtenidos (no mostrados) muestran que aún a la concentración más baja utilizada (1 μM) sigue habiendo inducción, pero nuevamente de proteína inactiva e insoluble.

6.2 Desnaturalización y diálisis para el replegamiento.

Al no lograr sobreexpresar la enzima a baja temperatura ni con bajas concentraciones de IPTG, se decidió intentar reactivar la enzima desde los cuerpos de inclusión. El replegamiento (refolding) de las proteínas es una estrategia que se ha utilizado con éxito para diversas proteínas, entre las que podemos mencionar la Creatina cinasa de *Torpedo californica* (Wang *et al.*, 2002) y a la dihidrofolato reductasa de *Pneumocystis carinii* (Delves *et al.*, 1993). Existen también referencias bibliográficas en las que se abordan las consideraciones prácticas para llevar a cabo dicho replegamiento (Tsumoto *et al.*, 2003), y en las que se habla de 2 etapas importantes para recuperar a las proteínas activas desde los cuerpos de inclusión: la solubilización y el replegamiento. La solubilización se lleva en una dispersión monomolecular y a una mínima interacción inter e intracatenaria.

La selección de agentes solubilizantes, como la urea, cloruro de guanidina y/o detergentes, pueden jugar un papel importante en la eficiencia de la solubilización, en la estructura de las proteínas desnaturalizadas y en el repliegamiento subsecuente. El repliegamiento, la segunda fase en la recuperación de la enzima activa, se inicia reduciendo la concentración del desnaturalizante utilizado para solubilizar los cuerpos de inclusión (a través de diálisis, por ejemplo). Sin embargo, el proceso de repliegamiento compite con otros, como el de la agregación, que puede volver a llevar a la proteína inactiva (Tsumoto *et al.*, 2003). Dicho de otra manera, el repliegamiento de una proteína no es cien por ciento seguro. La metodología que se utilizó aquí para el repliegamiento, fue descrita en la sección de materiales y métodos, e involucra el uso de urea, guanidina y el detergente tritón. Los resultados obtenidos en dichos experimentos se muestran en la Fig. 8. La proteína insoluble obtenida después de centrifugar a 10,000 r. p. m. (como se observó en la Fig. 6) fue sometida durante 12h a los tratamientos que se señalan en la Fig. 8, para después volver a centrifugarla. Como se observa, con excepción del tratamiento con urea 2 M, en donde la mayor parte de la proteína sigue insoluble, los diferentes tratamientos producen cerca de un 50% de proteína soluble, presente en el sobrenadante. Después de lograr esta solubilización parcial, la proteína fue sometida a diálisis, para bajar las concentraciones de los desnaturalizantes hasta el orden de concentraciones micromolares. La actividad en las muestras tratadas así siguió sin manifestarse.

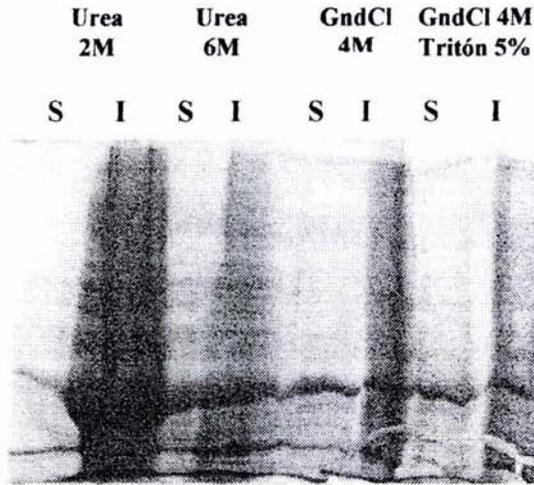


Figura 8 Solubilización de la proteína BADH sobreexpresada en *E. coli*. Proteínas solubles (S) e insolubles (I), después de incubar la proteína, precipitada durante la sobreexpresión (ver Fig. 6), en los tratamientos que se indican en la parte superior.

6.3 Obtención y clonación del gen *badh*.

Como un intento más para obtener la enzima BADH de amaranto en forma activa, se aislaron los RNAm desde las hojas de este vegetal sometidas a un estrés hídrico, para después obtener el cDNA (DNA complementario) utilizando la enzima transcriptasa reversa (RT) y oligonucleótidos específicos para el gen de *badh*. Posteriormente se sintetizó la doble cadena de uno de los genes *badh* de amaranto, con ayuda de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En la Fig. 9 se presenta una fotografía del gel de agarosa en donde se separaron los productos obtenidos (productos de RT-PCR).

Se observan dos bandas, con aproximadamente 1500 y 600 pares de bases (pb); la primera de ellas parecía corresponder al gen *badh*.

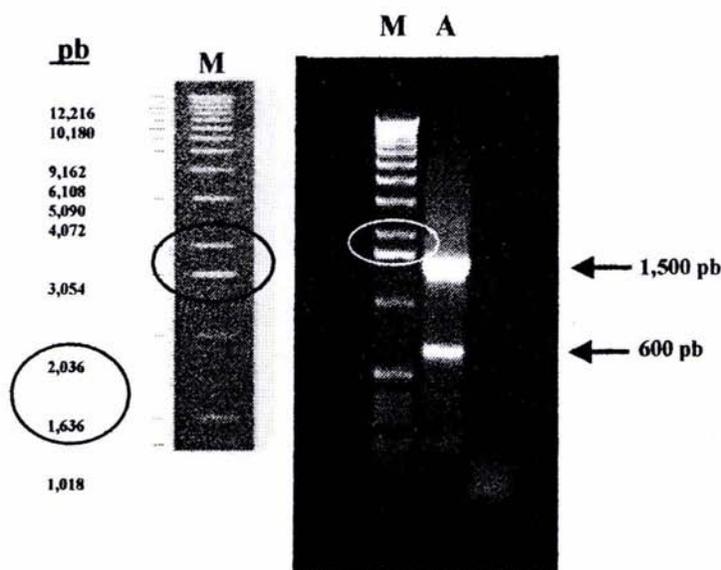


Figura 9 Obtención del gen *badh* de amaranto por RT-PCR. Los productos de RT-PCR (A) fueron obtenidos utilizando el kit “One-Step RT-PCR with platinum *taq*” y los oligos específicos para el gen *badh* de amaranto. M= Marcadores de tamaño. Los círculos son para marcar el mismo par de marcadores en el patrón comercial y en el separado junto con el gen. El DNA fue separado por electroforesis en geles de agarosa 1% y revelado con bromuro de etidio.

Para corroborar esto, la banda fue purificada y secuenciada en sus lados 5' y 3'. En la Fig. 10 se presenta la secuencia de aminoácidos deducida desde la de nucleótidos obtenida en el análisis, y se alinea con las deducidas desde los dos genes que previamente se habían descrito en las hojas de amaranto (Legaría *et al.*, 1998).

Alineación del lado amino

12
AHYBADH4 IDGEWREPIKKNRIPIINPSTEEIIGDIPAATAEDVELAVAAARRALKRNKGEDWASAG
 RT-PCR IDGEWREPIKKNRIPIINPSTEEIIGDIPAATAEDVELAVAAARRALKRNKGEDWASAG

72
AHYBADH4 AHRAKYLRAIAAKITEKKDYFAKLEAMDCGKPLDEAAWIDDVAGCFEYYADQAEALDAK
 RT-PCR AHRAKYLRAIAAKITEKKDYFAKLEAMDCGKPLDEAAWIDDVAGCFEYYADQAEALDAK

132
AHYBADH4 QKAPIALPMDTFKCHVLKQPIGVVGLISPWNYPLLMATWKVAPALAAGCSAVLKPSELAS
 RT-PCR QKAPIALPMDTFKCHVLKQPIGVVGLISPWNYPLLMATWKVAPALAAGCSAVLKPSELAS

192
AHYBADH4 VTCLELAEVCREVGLPPGV
 RT-PCR VTCLELAEVCREVGLPPGV

12
AHYBADH17 IDGEWREPIKKNRIPIINPSTEEIIGVIPAATAEDVELAVAAARRALKRNKGEDWASAG
 RT-PCR IDGEWREPIKKNRIPIINPSTEEIIGDIPAATAEDVELAVAAARRALKRNKGEDWASAG

72
AHYBADH17 AHRAKYLRAIAAKITEKKDYFAKLEAMDCGKPLDEAAWIDDVAGCFEYYADQAEALDAK
 RT-PCR AHRAKYLRAIAAKITEKKDYFAKLEAMDCGKPLDEAAWIDDVAGCFEYYADQAEALDAK

132
AHYBADH17 QKAPIALPMDTFKCHVLKQPIGVVGLISPWNYPLLMATWKVAPALAAGCSAVLKPSELAS
 RT-PCR QKAPIALPMDTFKCHVLKQPIGVVGLISPWNYPLLMATWKVAPALAAGCSAVLKPSELAS

192
AHYBADH17 VTCLELAEVCREVGLPPGV
 RT-PCR VTCLELAEVCREVGLPPGV

Alineación del lado carboxilo

```

282
AHYBADH4 TAFGCFWTNGQICSATSRLLVHESIAAEFLDRLVKWCKNIKISDPFEEGCR LGPVVSKSQ
RT-PCR   TAFGCFWTNGQICSATSRLLVHESIAAEFLDRLVKWCKNIKISDPFEEGCR LGPVVSKSQ
*****

342
AHYBADH4 YEKVLKFISTAKSEGATILCGGSRPEHLKKGYYVEPTIISDVSTSMQIWREEVFGPVL CV
RT-PCR   YEKVLKFISTAKSEGATILCGGSRPEHLKKGYYVEPTIISDVSTSMQIWREEVFGPVL CV
*****

402
AHYBADH4 KTFGSEDEAIELANDTQYGLGAAVLSKDLDR CERITKALQAGIVVWVNCSPFCQAPWGG
RT-PCR   KTFGSEDEAIELANDTQYGLGAAVLSKDLDR CERITKALQAGIVVWVNCSPFCQAPWGG
*****

462
AHYBADH4 TKRSGFGRELGEWGIENYL
RT-PCR   TKRSGFGRELGEWGIENYL
*****

282
AHYBADH17 TAFGCFWTNGQICSATSRLLVHESIAAEFLDRLVKWCKNIKISDPFEEGCR LGPVVSKSQ
RT-PCR   TAFGCFWTNGQICSATSRLLVHESIAAEFLDRLVKWCKNIKISDPFEEGCR LGPVVSKSQ
*****

342
AHYBADH17 YEKVLKFISTAKSEGATILCGGSRPEHLKKGYYVEPTIISDVSTSMQIWREEVFGPVL CV
RT-PCR   YEKVLKFISTAKSEGATILCGGSRPEHLKKGYYVEPTIISDVSTSMQIWREEVFGPVL CV
*****

402
AHYBADH17 KTFGSEDEAIELANDTQYGLGAAVLSKDLDR CERITKALQAGIVVWVNCSPFCQAPWGG
RT-PCR   KTFGSEDEAIELANDTQYGLGAAVLSKDLDR CERITKALQAGIVVWVNCSPFCQAPWGG
*****

462
AHYBADH17 TKRSGFGRELGEWGIENYL
RT-PCR   TKRSGFGRELGEWGIENYL
*****

```

Figura 10 Alineamiento de la secuencia de aminoácidos deducida del producto de RT-PCR, con las deducidas desde los genes *ahybadh4* y *ahybadh17*. Se comparan los lados amino y carboxilo de las proteínas. Los aminoácidos idénticos entre cada par de secuencias están marcados con asteriscos. La numeración corresponde a los genes *ahybadh4* y *ahybadh17*

De este análisis se pudo determinar que el gen que se sobreexpresa en la hoja de amaranto bajo estrés hídrico es el *ahybadh17*, esto por su alta identidad con el del producto de RT-PCR (99% y 100% del lado amino y carboxilo, respectivamente). La identidad entre el producto de RT-PCR y el gen *ahybadh4* es menor, sobretodo si consideramos el lado carboxilo de sus respectivas proteínas (96.5%). Entre el producto de RT-PCR y *ahybadh17* existe, sin embargo, una diferencia en el residuo 38, en el que Val (V) está sustituida por Asp (D) en el producto de RT-PCR. El cambio de un aminoácido hidrofóbico por otro polar es considerable, y podría ser la diferencia entre una proteína activa y la inactiva, con la que en ese momento se contaba ya sobreexpresada. Para corroborar esto, se procedió a clonar el gen obtenido por RT-PCR en el plásmido pCALn. Tanto el gen como el vector fueron sometidos a una digestión con las enzimas *Nde* I y *Eco* RI. Después, el vector fue desfosforilado y, habiéndose purificado a ambos (Fig. 11), se procedió a ligarlos. Como se observa en la Fig. 11, las bandas separadas en el gel de agarosa al 1% son del tamaño esperado: 1,500 pb para el gen y de aprox. 5,800 pb para pCALn.

Ligado el gen al vector, se transformó con ellos, y con ayuda de un shock térmico, a células de *E. coli* XL10-Gold previamente hechas competentes. Las células transformadas fueron seleccionadas en cajas de agar- LB conteniendo el antibiótico ampicilina. Las células que incorporan la clona vector-gen manifiestan resistencia hacia dicho antibiótico, mientras que las que no lo hacen son sensibles a él.

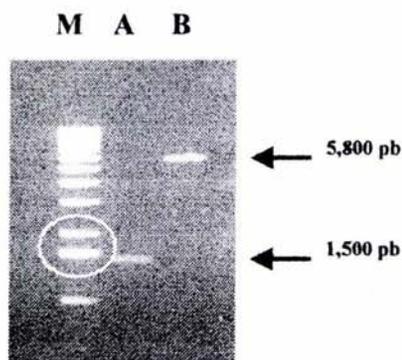


Figura 11 Gen de amaranto (obtenido por RT-PCR) (A) y plásmido pCALn (B) purificados después de digerirlos con las enzimas *NdeI* y *EcoRI*. M= marcadores de tamaño. El círculo es para tomar como referencia las proteínas marcadoras señaladas en la Fig. 9

A las células resistentes se les extrajo el plásmido para subclonarlo en la cepa de expresión de *E. coli* B121(DE3)pLysS. Las células transformadas fueron seleccionadas y sometidas a un protocolo de sobreexpresión con IPTG. Sus proteínas fueron después separadas en geles de poliacrilamida (datos no mostrados), en los que no se encontró sobreexpresión alguna de BADH. Visto esto, se decidió purificar el plásmido que confería resistencia a la bacteria, con el fin de caracterizarlo con una enzima de restricción que se sabe lo puede digerir (Fig. 12).

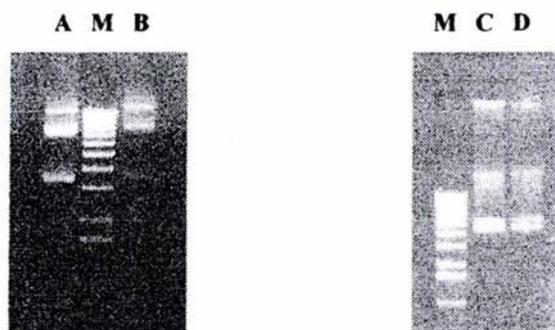


Figura 12 (A) Plásmido pCALn sin digerir. (B) Plásmido purificado desde *E. coli* BL21(DE3)pLysS transformada con el producto de ligación entre pCALn y el producto de RT-PCR. (C y D) Plásmido similar al obtenido en (B), pero digerido con *Nde* I. M=marcadores de tamaño.

Distinto a lo que se esperaba, que la digestión de la supuesta clona pCALn-*ahybadh17* con la enzima *Nde* I produjera una banda única de aproximadamente 7,300 pb, se encontraron varias bandas. Es sabido que los plásmidos dentro de las células guardan una conformación con distinto grado de superenrollamiento, lo que en un gel de agarosa los hace ver como distintas bandas (ver Fig. 12); esto parecía indicar que el plásmido purificado desde las células transformadas era distinto al esperado. Se repitió todo el procedimiento experimental (desde la digestión con *Not* I) por lo menos en una ocasión más, encontrando los mismos resultados al final. Visto esto, se decidió utilizar una alternativa más.

6.4 Clonación y sobreexpresión del gen *badh* de hoja de amaranto en levadura.

Ante la posibilidad de que la dificultad para lograr sobreexpresar el gen de amaranto en la bacteria *E. coli* se debiera a que se estaba trabajando con dos especies muy alejadas evolutivamente, un procarionte y un eucarionte, y por ende con dos mecanismos de traducción y postraducción muy distintos, se decidió intentar la clonación del gen *badh* en células de un eucarionte: la levadura (*Saccharomyces cerevisiae*). La fuente del gen *badh* fue el vector PBKS (Figura 13) que tenía inserto el gen *ahybadh17* y que fue donado por el Dr. Gabriel Iturriaga de la Fuente, del Instituto de Biotecnología de la UNAM. El plásmido PRS6 (Figura 14), también donado por Dr. Iturriaga, fue seleccionado como el vector en el que se realizaría la clonación e integraría el gen a la levadura. Esta estrategia de cambiar a la levadura por *E. coli* para sobreexpresar activa a una enzima, ya había sido utilizada anteriormente con éxito (Walker y Gingold 1997). Las enzimas de restricción que se seleccionaron para sacar el gen desde PBKS e insertarlo en PRS6 fueron *Not I* y *Sal I* (ver figuras. 13 y 14). Desafortunadamente, el gen también presentaba en su interior un sitio de digestión para *Sal I*, pero se decidió utilizarla pensando en realizar una digestión parcial al momento de utilizarla.

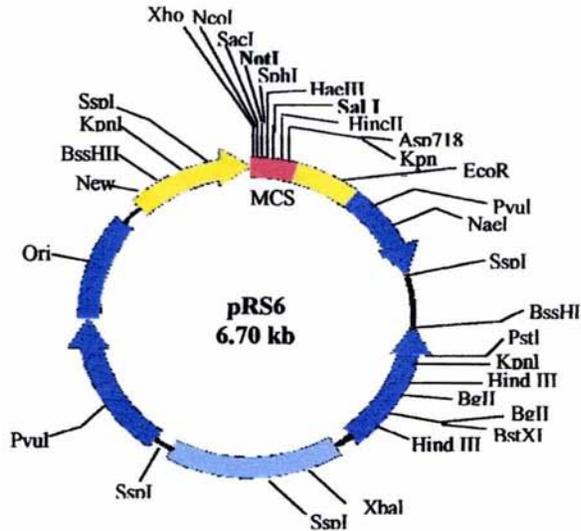


Figura 14. Esquema general del plásmido pRS6. Las líneas muestran los diferentes sitios de restricción. En negritas los sitios de corte para *NotI* y *SalI*. Este plásmido también posee el gen que confiere resistencia a penicilina

En la figura 15 se presenta un gel de agarosa en donde se separaron los digeridos con *Not I* de la clona PBKS- gen (banda de 4,500 pb = 3,000 del PBKS + 1500 del gen) y del pRS6 (banda de 6,700pb).

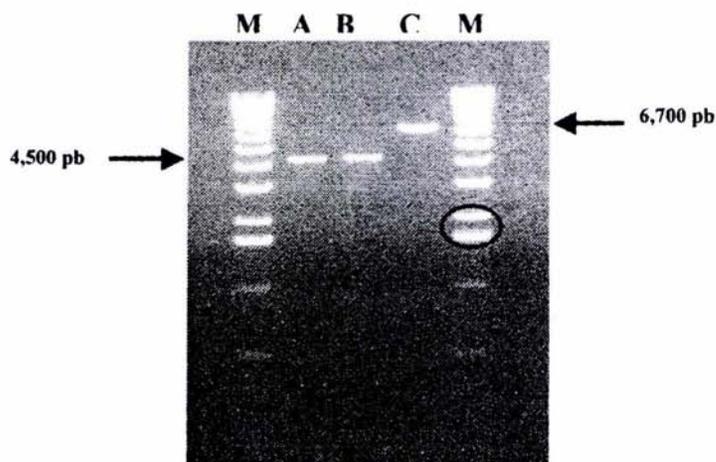


Figura 15 Plásmido PBKS, con el gen *badh* inserto (A y B), y PRS6 (C) purificados después de la digestión con la enzima *Not* I. M= marcadores de tamaño.

La digestión del gen unido al vector PBKS produjo, como se esperaba, un bajo rendimiento del *ahybadh17*, aún desde los primeros minutos de la digestión (banda de 1,500 pb en la Fig. 16). La banda de un tamaño mayor (aprox. 3,000 pb) corresponde al vector PBKS liberado, mientras que las dos menores (1,000 y 500 pb) son resultado del corte interno realizado por la enzima *Sal* I en el interior del gen. La digestión del vector PRS6 con *Sal* I se llevó a cabo sin ningún problema. En la Figura 17 se presenta después de esta digestión y una vez que se le defosforiló y se le purificó fenolizándolo (banda de 6,700 pb). En esta misma figura también se presenta el gel *ahybadh17* purificado después de la digestión con las dos enzimas (*Not* I y *Sal* I).

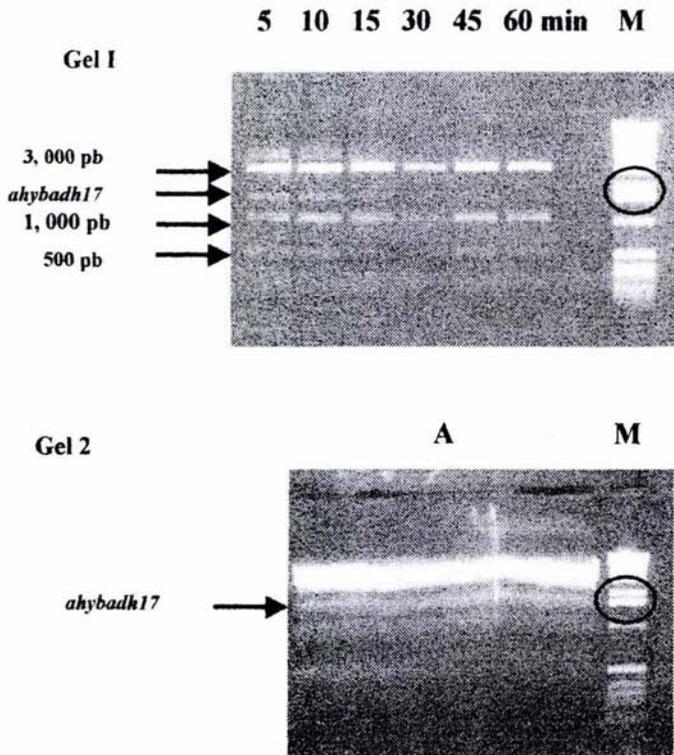


Figura 16 Gel 1, digestión de la clona PBKS-*ahybadh17* con la enzima de restricción *Sal* I, durante los tiempos que se indican arriba del gel. Gel 2, electroforesis preparativa para purificar *ahybadh17* (A), después de 4 min de la digestión como se muestra en Gel 1. M= marcadores de tamaño. El círculo es para tomar como referencia las proteínas marcadoras señaladas en la figura 9.

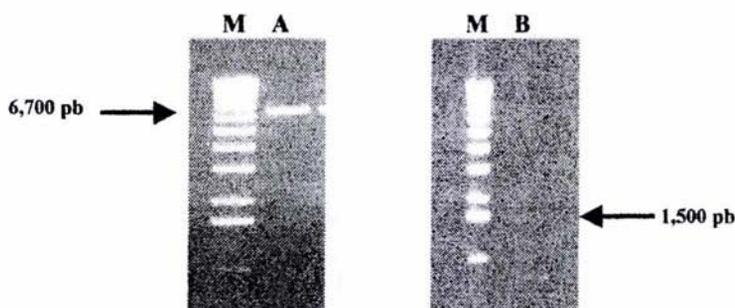


Figura 17 Vector PRS6 (A) y gen *ahybadh17* obtenido desde PBKS (B), purificados después de la digestión con *Not I* y *Sal I*. M= marcadores de tamaño.

Purificados el gen *ahybadh17* y el vector PRS6 desfosforilado, se les incubó con la enzima ligasa. En la Figura 18 se presenta el producto obtenido después de la actuación de esta enzima. Como se observa, el gen ligado a PRS6 tiene un tamaño aparente mayor al del vector, síntoma de la unión entre ambos.

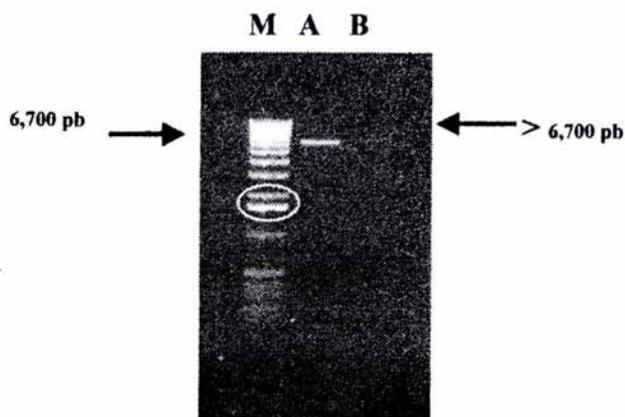


Figura 18 Plásmido PRS6 sin ligar (A) y ligado (B) con el gen *ahybadh17* obtenido desde el vector PBKS.

Una vez realizada la ligación se procedió a transformar a las células de levaduras, de acuerdo al método descrito en “Materiales y métodos”. En este experimento se incluyeron dos controles: (i) la transformación de levaduras utilizando PRS6 intacto y (ii) con PRS6 desfosforilado. La selección de las levaduras transformadas se realizó, como ya se mencionó en un medio libre del aminoácido Histidina (His). Esto considerando que la cepa de levadura utilizada presenta auxotrofia para este aminoácido y que el vector PRS6 le provee de las “herramientas” necesarias para poder llevar a cabo la síntesis de este aminoácido. Como se esperaba, el control (i) produjo un gran número de células de levadura transformadas, mientras que en el control (ii) no se observó una sola colonia. En el caso de la transformación realizada con el producto de la ligación se obtuvo un número reducido de colonias que podían crecer en ausencia del aminoácido His, síntoma de que habían sido transformadas. Después de esto se llevó a cabo el experimento para conocer si las células de levadura transformadas con PRS6-*ahybadh17* podían sintetizar a la enzima BADH. Los patrones proteicos obtenidos no presentaron alguna banda de proteína sobreexpresada.

Los resultados presentados en este trabajo, junto con los experimentos previos en los que sí se logró clonar el gen de la BADH de *Pseudomonas aeruginosa* y sobreexpresar a la enzima en forma activa, con los mismos sistemas de clonación y expresión utilizados aquí, sugieren que la enzima de amaranto podría requerir un sistema de expresión diferente que produzca una forma soluble y activa de la enzima.

Como un ejemplo de la complejidad que puede involucrar dicho sistema basta con mencionar el caso de la enzima ALDH2 de humano (Zhou y Weiner, 2001). Esta enzima es un tetrámero mitocondrial (con 500 aminoácidos cada monómero), y es codificada por un gen nuclear y sintetizada en el citoplasma como un precursor, con un péptido señal adicional de 17 aminoácidos en el extremo amino. En su viaje hacia la mitocondria, el precursor se enlaza a una proteína chaperona citosólica llamada hsp70, para lo que se requiere de la hidrólisis de ATP. Este complejo precursor-chaperona interactúa con uno o más receptores en la membrana externa de la mitocondria, cerca de un sitio de contacto de la membrana interna. El precursor ALDH2 es subsecuentemente translocado a través de las membranas mitocondriales externa e interna, por un canal compuesto de varios tipos de proteínas. El precursor importado se enlaza después a una chaperona de matriz denominada hsp70 de matriz, y su péptido señal es removido por una proteasa mitocondrial. Finalmente, la enzima ALDH2 se une a una chaperona multisubunidad, llamada hsp60, que en presencia de la hidrólisis de ATP asiste a la deshidrogenasa a plegarse de la manera correcta para ser activa. Se sabe que la Hsp60 no es homóloga de las chaperonas citosólicas, pero sí está relacionada con las chaperonas bacterianas llamadas GroEL y GroES (GroESL).

Se ha reportado que diferentes enzimas multiméricas pueden ser reconstituídas al interactuar con GroESL, por lo que varios investigadores han intentado reducir la formación de cuerpos de inclusión coexpresando sus proteínas junto con GroESL.

Algunos no han tenido éxito, pero entre los que lo han logrado se encuentran los investigadores que trabajan con la ALDH2 arriba mencionada.

Actualmente se desconoce la localización celular de la BADH de amaranto, sin embargo se sabe que en las hojas de espinaca, también dicotiledónea, la BADH se encuentra en el estroma del cloroplasto, por lo que podemos suponer que la enzima de amaranto podría situarse en el mismo organelo. Por otra parte, es sabido que los plástidos de las plantas superiores poseen un genoma con una limitada capacidad codificante, por lo que la gran mayoría de sus proteínas son codificadas en el núcleo e importadas desde el citosol (Miras, *et al.*, 2002). Considerando esto, podemos también suponer que el plegamiento de la enzima activa de amaranto requiere un sistema en donde podrían involucrarse chaperonas como las GroESL. Los trabajos futuros enfocados a tratar de sobreexpresar en forma activa a esta enzima deberán de considerar y probar si esta idea es acertada.

CONCLUSIONES

1. La enzima BADH de amaranto fue sobreexpresada en células de *E. coli* utilizando bajas temperaturas y bajas concentraciones del inductor IPTG; sin embargo, la enzima sobreexpresada se presentó inactiva y formando cuerpos de inclusión.

2. Los experimentos de desnaturalización y replegamiento no bastaron para reactivar a la enzima obtenida en dichos cuerpos.

3. Utilizando la técnica RT-PCR se pudo aislar un gen que presenta un alto porcentaje de identidad (> 99%) con el previamente aislado también desde hojas de amaranto (*ahybadh17*).

4. El producto de RT-PCR y el gen *ahybadh17* fueron clonados en dos diferentes vectores (pCALn y PRS6), transformando luego con ellos a *E. coli* y a *S. cerevisiae*, respectivamente; desafortunadamente las células transformadas seleccionadas no sobreexpresaron proteína alguna cuando se les expuso ante el inductor IPTG.

Los resultados obtenidos sugieren la necesidad de utilizar metodologías alternas para intentar obtener en forma activa la BADH de amaranto. Una de estas metodologías podría ser la coexpresión de la enzima y chaperonas del tipo GroESL.

BIBLIOGRAFÍA

Alejandro, I. G. y Gómez, L. F. 1999. Cultivo del amaranto en México. Universidad Autónoma Chapingo.

Arakawa, T. and Timasheff, S. N. (1985). The stabilization of proteins by osmolytes. *Biophys J.* **47**: 411-414.

Borowitzka, L. J., and Brown, A. D. 1974. The salt relations of marine and halophilic species of the unicellular green alga, *Dunaliella*: the role of glycerol as a compatible solute. *Arch. Microbiol.* **96**:37-52.

Delves, C. J., Volpe, F., and Ballantine, S. P. 1993. The multifunctional folic acid synthesis *fas* gene of *Pneumocystis carinii* encodes dihydroneopterin aldolase, hydroxymethyldihydropterin pyrophosphokinase and dihydropteroato synthase. *Eur. J. Biochem.* **216**: 449-458.

Flores, Z. M. 1994. Rendimiento, calidad nutricional y volumen de expansión de grano en cinco colectas de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) sometidos a fertilización potásica. Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma de Chapingo, Departamento de Fitotecnia.

Hanson, A. D. and Hitz, W. A. 1982. Metabolic Responses of mesophytes to plant water deficits. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **33**: 163- 203

Jakoby, W. J. 1963. Aldehyde dehydrogenases. En: Boyer, P. D. (ed.). *The Enzymes*, Vol. 7, 2nd ed., Academic Press, New York. pp.203-221.

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.

Legaria, J., Rajsbaum R., Muñoz, C. R. A., Villegas S. N.J. e Iturriaga, G. (1998). Molecular characterization of two genes encoding betaine aldehyde dehydrogenase from amaranth. Expression in leaves under short-term exposure to osmotic stress or abscisic acid. *Gene* **218**: 69-76.

Lindahl, R. 1992. Aldehyde dehydrogenases and their role in carcinogenesis. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **27**: 283-335.

López, V. M. C., Gasset, M., and Pajares, M. A. 2000. Refolding and characterization of Rat Liver Methionine Adenosyltransferase from *Escherichia coli*. **19**: 219-226.

Miras, S., Salvi, D., Ferro, M., Grunwald, D., Garin, J., Joyard, J. and Rolland, N. 2002. Non-canonical Transit Peptide for Import into the Chloroplast. *J. Biol. Chem.*, Vol. **277**, Issue **49**: 47770-47778.

National Research Council. 1984. *Amaranth. Modern Prospects for an Ancient Crop.* Rodale Press. E.U.A.

Rhodes, D. 1987. *The Biochemistry of Plants.* Academic Press. **12**: 201-240

- Rhodes, D. and Hanson, A. D.** 1993. Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol.* **44**: 357-384.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T.** 1980. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd. ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, N. Y.
- Trinidad, A. y Gómez, F.** 1986. El amaranto; su cultivo y aprovechamiento. Primer seminario Nac. del amaranto. Méx., p. 1- 301.
- Tsumoto, K., Ejima, D., Kumagai, L., and Arakawa, T.** 2003. Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies. *Protein Expression and Purification* **28**: 1-8.
- Valenzuela, S., E. M. and Muñoz, C. R. A.** 1993. Betaine aldehyde dehydrogenase from leaves of *Amaranthus hypochondriacus* L. exhibits an Iso ordered Bi Bi steady state mechanism. *J. Biol. Chem.* **268**: 23818-23824.
- Valenzuela, S. E. M. and Muñoz, C. R. A.** 1994. Purification and properties of betaine aldehyde dehydrogenase extracted from detached leaves of *Amaranthus hypochondriacus* L. subjected to water deficit. *J. Plant Physiol.* **143**: 145-152.
- Vierstra, R. D.** 1993. Protein Degradation in plants. *Annu. Rev. Plant Mol. Biol.* **44**: 385-410.
- Vojtechová, M., Rodríguez, S. R., Valenzuela, S. E. M. and Muñoz, C. R. A.**(1997). Substrate inhibition by betaine aldehyde of betaine aldehyde dehydrogenase from leaves of *Amaranthus hypochondriacus* L. *Biochim Biophys Acta* **1341**: 49-57.

Walker, J. M. y Gingold, E. B. 1997. *Biología molecular y biotecnología*. Acribia, S. A. España.

Wang, P. F., Novak, R. P. W., Cantwell, S. J., Babbitt, C. P., McLeish, J. M., and Kenyon, L. G. 2002. Expression of *Torpedo californica* creatine kinase in *E. coli* and purification from inclusion bodies. *Protein Expression and Purification* **26**: 89-95.

Wyn, J. R. G. and Storey, R. 1981. In *Physiology and Biochemistry of Drought Resistance in plants* (PALEG, L. G. and D. Aspinall, eds.). Academic Press, Sydney, pp. 171-204.

Yancey, P. H., Clark, M. E., Hand, S. C., Bowlus, R. D. and Somero, G. N. (1982) Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science* **217**: 1214-1217.

Zhou, J. and Weiner, H. 2001. The N- terminal portion of mature aldehyde dehydrogenase affects protein folding and assembly. *Protein Science*. **10**: 1490-1497.

GLOSARIO

Cebadores: Fragmento de hebra iniciadora, que aporta un grupo 3'-OH libre. Oligonucleótido, por lo común RNA, que debe estar apareado a la hebra progenitora de DNA, de forma complementaria y antiparalela. Elonga o alarga moléculas preexistentes.

Células competentes: La membrana plasmática muestra una permeabilidad selectiva y no admite grandes fragmentos de DNA recombinante, por lo que se acude a diversos métodos para facilitar su captación por alteración transitoria de la permeabilidad celular. El tratamiento más frecuente es de tipo fisicoquímico (tratamiento con CaCl_2), después del cual se dice que la célula se ha hecho competente.

Clonación: Es una forma de reproducción asexual que produce individuos genéticamente idénticos. Es el proceso de clonación consiste en la obtención de un *clon*, entendido como el conjunto de "elementos" genéticamente idénticos entre sí y a su precursor. Estos elementos pueden ser: moléculas, células, tejidos, órganos, moléculas tales como DNA, RNA entre otros.

Clonación acelular: Se refiere a la clonación de moléculas sin intervención de célula alguna. Es sinónimo de amplificación *in vitro* de moléculas de DNA o RNA mediante la reacción en cadena de la DNA polimerasa (PCR).

Clonación celular: Es la amplificación de moléculas de ácido nucleico mediante su introducción, asistida por vectores, en células anfitrionas en cultivo. Emplea la tecnología de DNA recombinante.

Clonación de células: Obtención de células aisladas o formando tejidos u órganos, mediante la clonación.

Clonación de moléculas: Reproducción específicamente de genes o fragmentos de DNA o RNA.

Clonación de organismos: Reproducción asexual de plantas o animales completos.

DNA polimerasa: Enzima que replican el DNA, tomando las instrucciones de la cadena DNA molde.

DNA recombinante: DNA que se forma combinando DNA de dos fuentes diferentes. Los humanos dirigen la formación de DNA recombinante mediante crianza selectiva o ingeniería genética.

Electroforesis: La separación de moléculas eléctricamente cargadas, a través de un disolvente, mediante la aplicación de un campo eléctrico.

Enzima de restricción: Llamadas también nucleasas de restricción, endonucleasas de restricción y, en ocasiones, enzimas restrictivas o restrictasas. Enzimas propias de distintas bacterias que rompen enlaces fosfodiéster, entre secuencias específicas de nucleótidos, localizados en el interior de los polinucleótidos.

Gen: Es una sección de una molécula de DNA que especifica la producción de una proteína determinada. Unidad física y funcional del material hereditario que determina un carácter del individuo y que se transmite de generación en generación.

Ligasa: Enzima que cataliza la formación de un enlace fosfodiéster para unir dos moléculas de DNA, con consumo de energía. La DNA ligasa forma enlaces fosfodiéster entre polinucleótidos alineados, para esto se requiere de un grupo OH libre en el extremo 3' de una cadena de DNA y un grupo fosfato en el extremo 5'; las cadenas unidas por la ligasa deben pertenecer a moléculas de DNA de doble hélice.

Oligonucleótidos: Segmentos cortos de DNA (de 15 a 45 nucleótidos), monocatenarias también llamado oligos.

PCR: Es una metodología cuyo objetivo es la amplificación directa de un gen o un fragmento de DNA, o indirecta de un RNA, a través de su cDNA (DNA complementario). Cada ciclo de una PCR consta de 3 etapas: desnaturalización, hibridación, replicación o elongación.

Plásmidos: Moléculas de DNA circular de doble hebra, de origen natural, de tamaño que oscila entre (2-5 kb), presentes en forma libre en el citosol de muchas bacterias y de algunos eucariotas unicelulares como las levaduras. Actúan como cromosomas accesorios y se replican en forma independiente al de su hospedador.

RT-PCR: Amplificación de un gen a partir de su RNAm. Consta de dos etapas: en la primera la enzima transcriptasa reversa (RT) sintetiza un cDNA específico a partir del RNA (total o mensajero) previamente purificado. En la segunda etapa se realiza la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para amplificar el cDNA obtenido en la primer fase, obteniendo así grandes cantidades de la doble cadena de DNA. Se utilizan oligos específicos del gen de interés.

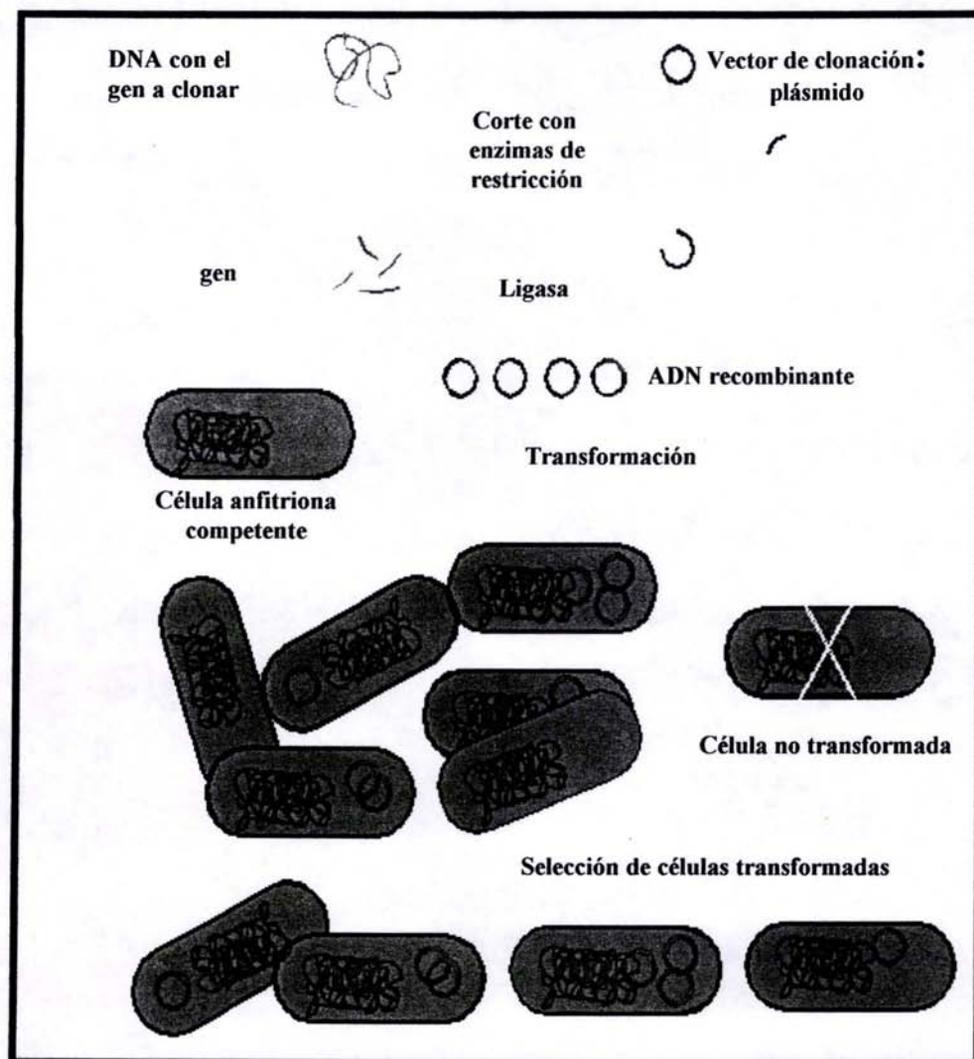
Selección de células resistentes: Células o colonias que han incorporado el DNA recombinante deseado, mediante métodos de detección (genes de resistencia a un antibiótico entre otros).

Sitio de restricción: Secuencias concretas del DNA, es a la vez lugar de reconocimiento y de hidrólisis.

Transcriptasa reversa: Es una DNA polimerasa dirigida por RNA. En este caso la información genética se dirige del RNA al DNA en un proceso inverso a la dirección normal de transferencia.

Transformación: Cambio en la estructura genética de un organismo como resultado de la incorporación de DNA ajeno. Ocurre espontáneamente en ciertos tipos de bacterias y se consigue artificialmente sometiendo a la célula bacteriana a tratamientos físicos y químicos.

ANEXO



Esquema general de la clonación celular (tecnología del DNA recombinante)