

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA.

“PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE
LA ASPARAGINASA II DE *Rhizobium etli*”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADA EN BIOLOGÍA

P R E S E N T A:

ANGÉLICA MORENO ENRÍQUEZ.

ASESOR: DR. ALEJANDRO HUERTA-SAQUERO.





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.

ÍNDICE

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

Asparaginasa como agente terapéutico contra la Leucemia Linfocítica Aguda _ _ _	2
Microorganismos como fuente de asparaginasa _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _	5
Estructura enzimática y mecanismo catalítico _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _	8
La asparaginasa de <i>Rhizobium etli</i> _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _	11

<u>ANTECEDENTES</u> _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _	12
--	----

OBJETIVOS

General _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _	16
Particulares _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _	16

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Primera Fase: Clonación de la asparaginasa II de <i>Rhizobium etli</i> en el vector de expresión pTrcHis A _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _	17
Segunda Fase: Purificación de His ₆ - ansa II _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _	19
Tercera Fase: Caracterización de la proteína recombinante His ₆ - ansa II _ _ _ _ _	20

RESULTADOS

I. Clonación del gen <i>ansA</i> que codifica para la asparaginasa II de <i>R. etli</i> en el vector de expresión pTrcHis A _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _	22
I. 1 Construcción genética _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _	23
I. 2 Retransformación en <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pPRIL _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _	24
I I. Purificación de la proteína recombinante His₆ - ansa II _ _ _ _ _ _ _ _ _ _	27
I I. 1 Masa molecular de His ₆ - ansa II _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _	28
I I I. Caracterización de la proteína recombinante His₆ - ansa II	

A. Parámetros bioquímicos	30
A.1. Estabilidad en gradiente de temperatura y pH	31
A.2. Parámetros cinéticos	34
A.3. Especificidad de His ₆ – ansa II por asparagina	35
A.4 Inhibición por productos de la asparaginasa	36
A.5. Actividad enzimática en presencia de iones divalentes	39
B. Parámetros fisicoquímicos.	
B.1.Punto Isoeléctrico (pI)	40
 <u>DISCUSIÓN</u>	 43
 <u>CONCLUSIONES</u>	 52
 <u>MATERIAL Y MÉTODOS</u>	
I. Cepas y Plásmidos	54
II. Medios de crecimiento y antibióticos	55
III. Primera fase: clonación del gen que codifica para la asparaginasa II de <i>R. etli</i> en el vector pTrcHis A	
III A. Amplificación del gen <i>ansA</i> de la asparaginasa II de <i>R. etli</i>	56
III B. Ligación de asparaginasa II y pTrcHis A	58
III C. Transformación de células competentes	59
III D. Selección de transformantes de <i>E. coli</i> JM109 por α - complementación y resistencia a antibiótico	60
III E. Análisis de restricción del plásmido <i>pANSA</i> con <i>Bam</i> H1 y <i>Eco</i> R1 ..	60
III F. Determinación de la actividad de asparaginasa II de <i>R. etli</i> de extractos celulares de <i>E. coli</i>	61
IV. Segunda fase: purificación de His₆ – ansa II	
IV A. Protocolo de ensayo control de la sobreexpresión	63
IV B. Sobreexpresión de la asparaginasa II y extracción de la proteína recombinante His ₆ – ansa II	64

IV C. Purificación por cromatografía de afinidad de la proteína recombinante His ₆ – ansa II	65
IV D. Diálisis de la proteína recombinante His ₆ – ansa II	66
IV E. Determinación de la actividad específica de His ₆ – ansa II	66
V. Tercera fase: caracterización de la proteína recombinante His₆ – ansa II	67
VI. Otros métodos	
VI A. Gel de agarosa al 1 %	69
VI B. Extracción de DNA de plásmido mediante lisis alcalina a mediana escala	69
VI C. Purificación de plásmido a pequeña escala	71
VI D. Digestión de pTrcHis A con enzimas de restricción <i>Bam</i> H1 y <i>Eco</i> R1	73
VI E. Preparación de células competentes de <i>E. coli</i> BL21 (DE3)	73
VI F. Cuantificación de proteína total por Bradford	75
VI G. Preparación de membranas para diálisis	75
VI H. Geles para electroforesis de poliacrilamida	76
<u>ANEXOS</u>	
ANEXO 1. Vector de expresión pTrcHis A	79
ANEXO 2. Columna Hi–Trap Chelating	79
<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	80

RESUMEN

En el presente trabajo se estudio la asparaginasa II de *R. etli*, mediante una proteína recombinante. El gen *asnA* que codifica para la asparaginasa II de fue amplificado por PCR y clonado en el vector de expresión pTrcHis A. El plásmido obtenido (pANSA) fue inducido con IPTG y la proteína fue purificada a homogeneidad por cromatografía de afinidad. La proteína recombinante His6 - ansa II fue purificada 28 veces con un rendimiento del 97 %, presentado una actividad específica de 20 000 UI. La masa molecular de la enzima en condiciones nativa y desnaturalizantes fueron de 101.9 kDa y 49.6 kDa respectivamente, lo que sugiere que la enzima en su estado nativo es un homodímero. El punto isoeléctrico fue de 8.9. La asparaginasa II de *R. etli* presentó estabilidad en gradiente de temperatura a 50 °C y a pH 9 con 200 000 UI de actividad específica bajo estas condiciones. Además, se comprobó la termolabilidad de la proteína la cual pierde el 83 % de su actividad después de 30 min de incubación a 50 °C.

La enzima fue altamente específica a asparagina y no hidrolizó glutamina. Se inhibió en presencia de los análogos de asparagina β -aspartil hidroxamato, D- asparagina, L- glutamina y D- glutamina. También presentó inhibición por los cationes divalentes Ca^{2+} , K^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} . La K_m de la asparaginasa fue de 10 mM mientras que la V_{max} presentó 250 nmoles $\text{NH}_4/\text{min}/\text{mgP}$. La enzima fue inhibida competitivamente por asparatato y acompetitivamente por amonio, con una K_i de 33.36 y 10 mM, respectivamente.

Al parecer la asparaginasa II de *R. etli*, se encuentra formando un grupo diferente de proteínas del resto de las asparaginasas reportadas. Hecho que la identifica como una asparaginasa atípica.

La asparaginasa II de *R. etli* es una candidata para estudiar su efecto antilinfoma, así como para determinar su actividad inmunosupresiva. Esos datos permitirán en un futuro, considerar el uso de la asparaginasa II de *R. etli* como alternativa en el tratamiento de la LLA.

Tenemos zapatos, orgullo, presente, tenemos costumbres, pudores, jadesos,
Tenemos la boca, la lengua, los dientes, saliva, cinismo, locura, deseo.

INTRODUCCIÓN

La asparaginasa (EC 3.5.1.1) es la enzima que cataliza la desamidación hidrolítica de asparagina (asn) a aspartato (asp) y amonio (NH_4^+) (Fig. 1). Tanto el sustrato como los productos de esta reacción enzimática juegan un papel muy importante en diversas reacciones metabólicas en todos los organismos, desde bacterias hasta mamíferos.

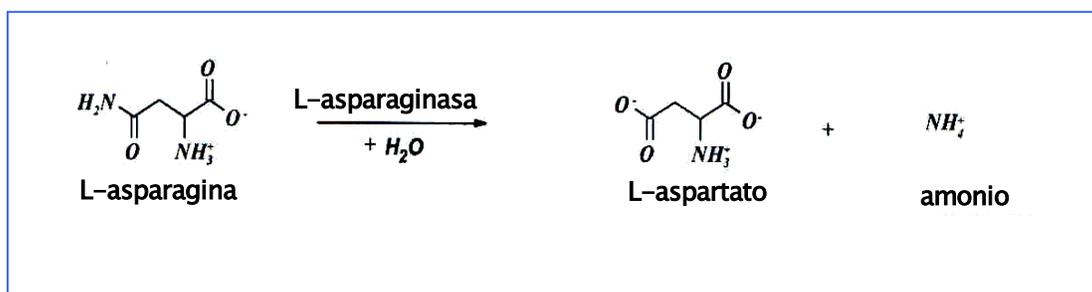


Fig. 1. Desamidación hidrolítica de asparagina por la enzima asparaginasa. Los productos de la reacción son aspartato y amonio.

En las plantas la asn es el metabolito más abundante de almacén y transporte de nitrógeno que se utiliza para la biosíntesis de proteínas (Sieciechowicz *et. al.*, 1988), también puede actuar como única fuente de nitrógeno durante el desarrollo de los tejidos (Casado *et. al.*, 1995). En las leguminosas, la asn es el compuesto nitrogenado más abundante en la savia del floema y dado que el 60% de las proteínas de la semilla se originan del nitrógeno amido, una asparaginasa está presente durante el proceso de deposición de proteínas en las semillas (Ortuño y Durán, 2000).

En el cuerpo humano, el asp juega un papel importante como precursor de ornitina en el ciclo de la urea y en reacciones de transaminación formando oxaloacetato. Por otra parte, la asn es utilizada en la ruta gluconeogénica (Borek y Jalkósky, 2001). La asn se encuentra en una concentración de 50 μM en el torrente sanguíneo (Kitto *et. al.*, 1979).

La asparaginasa de origen animal cobró importancia cuando en 1953, Kidd encontró que el suero del cobayo podía causar la regresión de ciertos linfomas establecidos en ratón. Mas tarde, Broome en 1967 identificó al componente responsable de ese efecto como una asparaginasa. Posteriormente, Mashburn y Wriston (1964) aislaron a la asparaginasa del suero de cobayo y demostraron que tenía actividad antilinfoma. Asimismo, aislaron una asparaginasa de *Escherichia coli* y demostraron que también tenía actividad antilinfoma (Mashburn y Wriston, 1966). Debido a ese efecto, las asparaginasas de algunos microorganismos han recibido una especial atención debido a su potencial clínico desde hace ya 30 años.

LA ASPARAGINASA COMO AGENTE TERAPEÚTICO CONTRA LA LEUCEMIA LINFOCÍTICA AGUDA.

La leucemia linfocítica aguda (LLA), es una enfermedad maligna progresiva que se caracteriza por la proliferación de un gran numero de células blancas sanguíneas inmaduras que se pueden encontrar en la sangre, la medula ósea, los ganglios linfáticos, el bazo y otros órganos (Huerta-Zepeda, 2000). Las células leucémicas pierden la capacidad de madurar y diferenciarse y se multiplican rápidamente reemplazando a las células normales. La LLA es la enfermedad maligna mas común en pediatría y es responsable de alrededor del 30% de las neoplasias de la infancia, el 75% de los pacientes corresponde a menores de 15 años (Lee et. al., 1995), y presenta un máximo de incidencia entre los 3 y 7 años (6 de cada 100 00 personas). La incidencia de la LLA es máxima en la infancia, declina alrededor de los 30 años y después de los 40 años vuelve a aumentar con leve predominio en el género masculino. Los factores de riesgo para desarrollar la LLA son el Síndrome de Down, un familiar con leucemia, la exposición a radiaciones, exposición a algunos compuestos químicos y algunos medicamentos (Huerta-Zepeda, 2000).

La quimioterapia es el tratamiento inicial por excelencia que se emplea para LLA durante las fases de remisión y mantenimiento de remisión de la enfermedad y en la etapa de consolidación se recurre a tratamientos biológicos complementarios o alternos que garantizan la disminución reforzada de células leucémicas residuales (Lee et. al., 1995). Entre los tratamientos complementarios, se utilizan las asparaginasas de *E. coli* (tipo II) y *Erwinia chrysantemii* (Avramaris et. al., 2002).

La asparaginasa se aplica en adultos vía intravenosa 200 UI/Kg de peso corporal por día durante 20 días, en niños se aplica intramuscular 6.000 UI/m² de superficie corporal en los días 4, 7, 10, 13, 16, 19, 22, 25 y 28 del periodo de tratamiento en combinación con fármacos oncológicos (www.Filaxis.com).

La actividad antineoplásica de la asparaginasa resulta de la reducción de los niveles de ans en la circulación sanguínea, ya que las células cancerosas requieren de este aminoácido para crecer (Kafkewitz y Bendich, 1983; Asselin, 1999). Aunque la ans no es un aminoácido esencial, las células dependen de él para la síntesis normal de proteínas; se ha comprobado que la asparaginasa inhibe hasta en un 98% la proliferación de linfocitos (Bromme, 1967). Durante el tratamiento con asparaginasa, las células normales compensan la falta de asparagina sintetizándola a partir del ácido aspártico y amonio vía la asparagina sintetasa (AS) (Hutson et. al., 1997). Las células malignas tienen niveles muy bajos de AS, por lo que en presencia de asparaginasa disminuye rápidamente la síntesis de proteínas, llevándolas a una demora en la síntesis de DNA y RNA y por lo tanto, a un daño en la función celular (Stams et. al., 2003). Se ha observado que las células sensibles al tratamiento con asparaginasa son arrestadas en la fase G1 del ciclo celular (Lee et. al., 1995), lo que genera la muerte selectiva de las células (Gallager et. al., 1989). Se ha propuesto que la terapia con asparaginasa puede desencadenar la inducción de rutas apoptóticas (Bussolati et. al., 1995), puesto que experimentalmente se

observa la fragmentación del DNA en células L5178V debido al arresto que sufren en la fase G1 (Ueno, 1997).

A pesar de la amplia distribución de L-asparaginasa en la naturaleza, solamente las enzimas de dos microorganismos han sido ampliamente estudiadas y son utilizadas rutinariamente para el tratamiento de la LLA: La asparaginasa II de *E. coli* y la de *E. chrysanthemi*. Esas enzimas se seleccionaron debido a su elevada afinidad hacia la asparagina, a su estabilidad bajo condiciones fisiológicas y a su fácil producción a gran escala. Dichas enzimas presentan una vida media en el suero de 1.24 y 0.65 días respectivamente, poseen diferente especificidad inmunológica y no existe reacción antigénica cruzada entre ambas, por lo que pueden intercambiarse durante la terapia contra la leucemia si se presentan reacciones inmunes (Asselin *et. al.*, 1993).

La asparaginasa es un fármaco bioquímico efectivo contra la LLA así como para otros tipos de linfomas. Sin embargo, la terapia con asparaginasa llega a provocar ciertas complicaciones durante el tratamiento. Se reportan principalmente reacciones inmunes como resultado del origen bacteriano de la enzima, así como efectos adversos sobre varios órganos y sistemas, producto de la disminución en la disponibilidad de la asparagina y la consecuente disminución en la síntesis de proteínas (Ortuño y Durán, 2000). Los efectos colaterales vinculados con el bloqueo de la producción protéica consisten en un descenso de los niveles de albúmina, insulina y lipoproteínas (hipocolesterolemia e hiperlipidemia), así como en los factores de coagulación (Castaman y Rodeghiero, 1993; Müller y Boos, 1998).

A pesar de los efectos secundarios causados por la terapia con asparaginasa, esta enzima continúa siendo el principal tratamiento en la fase de consolidación contra la LLA, lo que ha llevado a estudiar otras fuentes de asparaginasa para reducir la inmunogenicidad al fármaco.

Por otro lado, se ha intentado aumentar su vida media en la sangre mediante unión covalente a derivados del polietilenglicol (PEG) (Kafkewitz y Bendich, 1983). La asparaginasa II de *E. coli* modificada con PEG se usa regularmente cuando se presentan reacciones de hipersensibilidad hacia la asparaginasa nativa. El conjugado presenta una vida media en el organismo de 5.73 días (Learth et. al., 2002).

Algunas asparaginasas también poseen actividad de glutaminasas. En el caso donde la glutamina (gln) es un mejor sustrato, la enzima es conocida como glutaminasa-asparaginasa (EC3.5.1.38) (Borek y Jaskólski, 2001). El uso de estas enzimas provoca reacciones secundarias en el organismo, debido a la eliminación de gln en el torrente sanguíneo (Kafkewitz y Bendich, 1983). La asparaginasa II de *E. coli* y de *E. chrysantemii* presentan esta característica, con buena afinidad por la glutamina.

Kafkewitz y Bendich (1983) comprobaron que el tratamiento con enzimas que degradan gln y asn pueden causar rápidamente inmunosupresión. Los efectos de dicha reacción inmunológica estaa dados por la degradación de gln en torrente sanguíneo, lo que provoca un efecto inmunosupresivo debido al déficit nutricional (Kafkewitz y Bendich, 1983). Las asparaginasas que no degradan gln no presentan este efecto inmunosupresivo.

MICROORGANISMOS COMO FUENTE DE ASPARAGINASA.

Las enzimas con actividad de asparaginasa han sido estudiadas en bacterias de los grupos Gram negativas y Gram positivas, así como en plantas y animales. Las asparaginasas de *E. coli* y *E. chrysantemii* se han caracterizado ampliamente, mientras en otros organismos aun se desconoce su localización y función específica. El siguiente cuadro resume las características de L-asparagina en algunos organismos.

CUADRO 1. CARACTERÍSTICA DE L-ASPARAGINASAS EN MICROORGANISMOS.

ORG.	TIPO	PARÁMETROS CINÉTICOS	CONFIGURACIÓN	CARACTERÍSTICAS
1. <i>E. coli</i>	I	♦Km 3.5 mM	♦Dímero de 64 kDa con subunidades de 35.4 kDa	♦Citoplasmática. ♦Constitutiva. ♦Se inhibe con DONV*. ♦Degrada asparagina para utilizarla como fuente de nitrógeno.
2. <i>E. coli</i>	II	♦Km 11.5 µM ♦Km Gln 6.25 mM	♦Tetrámero de 140 kDa con subunidades de 36.85 kDa.	♦Periplásmica. ♦Inhibida por DONV. ♦Provee fumarato como un aceptor terminal de electrones (2A).
3. <i>E. chrysanthemi</i>		♦Km 18 µM. ♦Km Gln 1.1 mM	♦Homotetrámero con subunidades de 32 kDa.	♦Sujeta a represión catabólica. ♦Periplásmica. ♦Probablemente tenga la misma función que la asparaginasa II de <i>E. coli</i> .
4. <i>C. glutamicum</i>		♦¿?	♦Masa Molecular de 80 kDa.	♦Constitutiva ♦Inhibida por DONV. ♦No degrada gln.
5. <i>E. aroidea</i>		♦Km 2.8 µM	♦Tetrámero de 155 kDa con subunidades de 38 kDa.	♦Temp. 45 °C. ♦pH 8.2
6. <i>P. geniculata</i>	A	♦Km 0.1 µM.	♦96 kDa.	♦No degrada gln. ♦Sin actividad antitumoral en células cancerosas de ratón.
	AG	♦1.5 X 10 ⁻⁵ M.	♦Tetrámero de 135 kDa.	♦Degrada gln al 50 % de su actividad enzimática (AG). ♦Actividad antiproliferativa en células Gardner 6CeHED y de ratón C3H.

7. <i>V. succinogenes</i>	♦Km 4.7 X 10 ⁻⁵ M	♦Tetrámero de 146 kDa con subunidades de 37 kDa	♦No hidroliza Gln ♦pI 8.74 ♦pH 7.3
8. <i>Staphylococcus</i>	♦Km 3.71 X 10 ⁻² M	♦¿?	♦Inhibición competitiva por D-ácido glutámico, L-ácido aspártico y N-αacetil L-asparagina. ♦Inhibición por Hg ²⁺ y Cu ²⁺ . La activan Na ⁺ y K ⁺ . ♦pH 8.6 - 8.8 ♦Temp. 30 °C.
9. <i>Chlamydomona</i>	♦Km 1.34 X 10 ⁻⁴ M	♦Tetrámero de 275 kDa	♦Posee limitada actividad antitumoral.
10. <i>E. carotovora</i>	♦Km 98 X 10 ⁻⁶ M ♦KmGln 3.4X10 ⁻³ M	♦¿?	
11. <i>T. thermophilus</i>	♦Km 2.8 mM (11A)	♦Hexámero de 200 kDa con subunidades de 33 kDa.	♦Probada en diferentes linajes cancerosos con muy alta actividad antitumoral. ♦Temp. 80 °C. ♦pH 9.2 (11.A) ♦pI 6.0 (11.A)
12. <i>T. termophila</i>	I	♦¿?	♦No degrada gln ♦pH 8.6
	II	♦¿?	♦No degrada Gln. Se activa con Ca ²⁺ . Se inhibe por fosfolipasa C. ♦pH 7.4
13. <i>T. pyriformis</i>	♦Km 2.2 mM	♦Hexámero de 230 kDa con subunidades de 39 kDa.	♦No hidroliza Gln. Se inhibe competitivamente por ácido aspártico y D-asn. ♦pH 8.6 ♦pI 6.8
14. <i>P. stutzeri</i>	♦Km 1.45 X 10 ⁻⁴ M	♦Actúa como monómero de 34 kDa.	♦Se inhibe competitivamente por DONV*. ♦Se inhiben por Mn ²⁺ , Zn ²⁺ , Hg ²⁺ , Fe ³⁺ , Ni ²⁺ , Cd ²⁺ . ♦Actividad antiproliferativa. ♦pI 6.38 ♦pH 9 ♦Temp. 37 °C.

15. <i>C. freudii</i>	A	♦Km 2.9 X10 ⁻⁵ M.	♦Tetrámero de 140 kDa con subunidades de 33 kDa.	♦Inactivada por cloromercuribenzoato. ♦Degrada gln. ♦Termolábil.
	B	Km 1.7 X 10 ⁻³ M.		♦Actividad antiproliferativa. ♦Degrada Gln.
16. <i>S. cerevisiae</i>	I	♦Km 0.25 mM	♦¿?	♦Constitutiva. ♦Glicoproteína de pared celular con actividad de asparaginasa.
	II	♦Km 0.35 mM	♦¿?	♦Reprimida por la fuente de Nitrógeno.
17. <i>B. subtilis</i>		♦Km 55 mM	♦¿?	♦Sujeta a represión catabólica por nitrógeno.

*DONV (5-diazo-4oxo-L-norvaline). Citas: 1. *Escherichia coli*. Ortuño y Durán, 2000; 2. Cedar y Schwartz, 1968; 2A. Jennings y Beachman, 1993; 3. *Erwinia chrysanthemii*. Callow *et. al.*, 1971; 4 *Corynebacterium glutamicum*. Mesas *et. al.*, 1990; 5. *Erwinia aroidea*. Tiwari, 1996; 6. *Pseudomona geniculata*. Kitto *et. al.*, 1979; 7. *Vibrio succinogenes*. Distasio *et. al.*, 1976; 8. Sobris y Mikucki, 1991; 9. Paul, 1982; 10. *Erwinia carotovora*. Krasotkina *et. al.*, 2003; 11. *Thermus thermophilus*. Pritsa y Kyriadikis, 2001; 11A. Pritsa *et. al.*, 2001. 12. *Tetrahymena thermophila*. Tsavdaridis *et. al.*, 1994; 13. *Tetrahymena pyriformis*. Triantafillou *et. al.*, 1980; 14. *Pseudomonas stutzeri*. Manna *et. al.*, 1995; 15. *Citrobacter freudii*. Davidson *et. al.*, 1977; 16. *Saccharomyces cerevisiae*. Dunlop *et. al.*, 1980; 17. *Bacillus subtilis*. Sun y Setlow, 1991.

ESTRUCTURA ENZIMÁTICA Y MECANISMO CATALÍTICO.

Como resultado de la actividad antineoplásica de la asparaginasa y de las reacciones secundarias que provoca la aplicación de las enzimas de *E. coli* y *E. chrysanthemi*, existe un gran interés por asparaginasas de alta afinidad de otros microorganismos, así como por el análisis detallado de sus estructuras.

Las asparaginasas de microorganismos se han clasificado dentro de dos grupos con base en la secuencia de sus residuos de aminoácidos y su localización. En el primer grupo se incluyen enzimas citosólicas probablemente constitutivas y con función similar entre ellas. En un segundo grupo se encuentran las asparaginasas probablemente periplásmicas, con alta afinidad hacia la asparagina y actividad de glutaminasa (Borek y Jaskólski, 2001).

Los estudios cristalográficos y análisis de secuencias de los residuos de aminoácidos de asparaginasas tipo II han mostrado poseer dos motivos de aminoácidos altamente conservados que forman parte del sitio activo (Fig. 2).

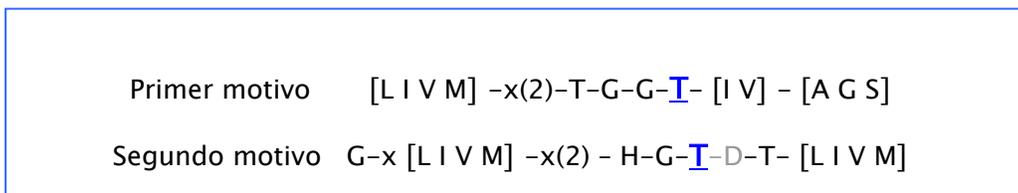


Fig. 2. Motivos de residuos de aminoácidos conservados del sitio activo en asparaginasas bacterianas. **I**: residuos aparentemente más importante del sitio activo, que corresponde a la Treonina-89.

Los estudios sobre las asparaginasas de tipo II reportadas previamente muestran una conformación homotetrámerica con cuatro sitios activos. Cada sitio activo incluye a los residuos de aminoácidos de los motivos conservados. En esta enzima la probable triada catalítica esta formada por Treonina - 89, Ácido aspártico - 90 y Lisina - 162 (Swain et. al., 1993). Sin embargo, parece necesaria la asociación tetramérica para que la enzima muestra actividad (Swain, et. al. 1993).

Con base en la caracterización estructural de los residuos de aminoácidos de la asparaginasa II de *E. coli*, que ha sido cristalizada con el aspartato unido, y considerando la cercanía de sus cadenas laterales, se ha señalado a los residuos de aminoácidos Treonina-12, Tirosina-25, Serina-58 y Treonina-89 como los nucleófilos potenciales. De estos residuos, la Treonina-89 es el más cercano al grupo β - del carboxilo del aspartato unido, de tal forma que si la posición y orientación del producto es la misma que la del sustrato, el residuo de la Treonina - 89 es el candidato más probable para ser el nucleófilo (Swain et. al., 1993).

Las estructuras cristalinas de las asparinasas de *Pseudomonas sp*, *Wolinella succinogenes*, *E. crhysantemii* y *Acinetobacter glutaminasificans* son muy similares a la descrita para *E. coli*. La tríada catalítica esta muy conservada en todas las secuencias reportadas de asparinasas y se han postulado como residuos que participan directamente en la reacción enzimática. La conservación de la identidad y conformación de las enzimas sugiere un mecanismo común para la desamidación de la asparagina (Borek y Jaskólski, 2001).

En el genoma de *E. coli* existen dos genes que codifican para asparinasas; sus secuencias presentan sólo un 24% de identidad, lo que sugiere un distinto origen evolutivo. Sin embargo, ambas asparinasas presentan los motivos de aminoácidos conservados del sitio activo. La estructura cuaternaria de estas dos enzimas es diferente, ya que la asparinasa I funciona como homodímero, mientras que la asparinasa II lo hace como homotetrámero. La hidrólisis de la asparagina por cada una de estas dos enzimas posiblemente se de en forma diferente (Swain et. al., 1993).

En *Saccharomyces cerevisiae* las dos asparinasas se parecen más entre sí (45%) que a cualquiera de las enzimas bacterianas, pero podrían considerarse asparinasas de tipo II (a pesar de que la asparinasa I de *S. cerevisiae* es citosólica) puesto que presentan mayor homología con la asparinasa II de *E. coli*. Considerando la existencia de dos asparinasas (una intracelular y otra extracelular) tanto en *E. coli* como en *S. cerevisiae* y el hecho de que las asparinasas de *S. cerevisiae* se parecen más entre sí que a la de procariontes, es probable que haya ocurrido una duplicación de genes en forma independiente tanto en procariontes como en eucariontes (Bonthon y Jaskólski, 1997). En otros eucariontes se ha estudiado muy poco la presencia de asparinasas; las secuencias reportadas hasta hoy, son probables enzimas con actividad de asparinasa cuya función se desconoce. En *Homo sapiens* se ha reportado una enzima con actividad de asparinasa llamada Glicosilasparinasa que cataliza la hidrólisis de asparagina además de llevar a cabo la síntesis e hidrólisis de β -aspartil péptidos de los cuales aún se desconoce su función (Nostonkoski et. al., 1998).

La purificación y obtención de las estructuras cristalográficas de varias asparaginasa ha hecho posible conocer la estructura de este grupo de enzimas y estudiar su mecanismo catalítico.

LA L-ASPARAGINASA DE *Rhizobium etli*

El género *Rhizobium* está formado por bacterias que fijan nitrógeno cuando establecen relación simbiótica con leguminosas en estructuras conocidas como nódulos. Los nódulos se forman en las raíces de la planta y hospedan a bacterias especializadas en la fijación de nitrógeno conocidas como bacteroides. Es durante esta relación cuando la planta provee al bacteroide de fuentes de carbono que utiliza para producir energía y reducir el nitrógeno atmosférico; el amonio producido es liberado por los bacteroides y metabolizado por las plantas (Reichbach, 1983). Durante la vida libre de *R. etli* y su interacción simbiótica, se ha comprobado que la utilización de aminoácidos es muy importante (Khan et. al., 1985).

R. etli es capaz de crecer en asparagina como única fuente de nitrógeno y carbono (Sun y Setlow, 1991) a través de la acción coordinada de la asparaginasa y la asparatasa (Huerta-Zepeda et. al., 1996). *R. etli* posee dos enzimas con actividad de L-asparaginasa: L-asparaginasa I, que es termoestable y constitutiva, y que probablemente regula las concentraciones de asparagina y asparatato (Huerta-Zepeda, et. al. 1997); mientras que L-asparaginasa II es termolábil, inducida por asparagina y reprimida por la fuente de carbono; su función principal es utilizar la asparagina como fuente de carbono (Ortuño-Olea y Durán-Vargas, 2000).

En el catabolismo de la asparagina como fuente de carbono también participa la L- asparatasa (EC 4.3.1.1) que cataliza la desamidación del L-aspartato para producir fumarato y amonio (Fig. 3).

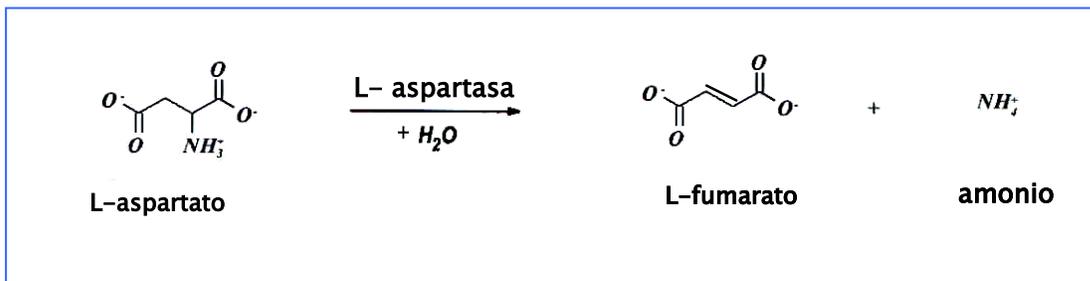


Fig. 3. Desamidación de L- aspartato por la enzima aspartasa. Los productos de la reacción son L-fumarato y amonio.

En la búsqueda de fuentes alternas de asparaginasa que puedan ser utilizadas como fármacos inmunológicamente menos activos pero más específicos, para el tratamiento de la fase de consolidación de la LLA, nos dimos a la tarea de estudiar a la asparaginasa II de *R. etli*. Esta enzima posee características muy diferentes a las otras asparaginasa como veremos más adelante.

ANTECEDENTES

En nuestro laboratorio se encontró evidencia de que en el catabolismo de la asparagina están íntimamente relacionadas la L- asparaginasa y la L-aspartasa (Huerta-Zepeda et. al., 1996). Estudios con una mutante de *R. etli*, llamada AHZ7 seleccionada por su incapacidad de crecer en asparagina como fuente de carbono y nitrógeno, mostró que presenta alteradas las actividades de asparaginasa y aspartasa. Dicha mutante fue complementada con un banco de DNA de *R. etli*. El análisis de la secuencia del cósmido (pAHZ12) que la complementa reveló la presencia de 4 marcos abiertos de lectura (Ortuño - Olea y Durán - Vargas, 2000).

El primer marco de lectura abierto corresponde al gen *ansR*, que presenta identidad en la región C-terminal de la proteína con el motivo hélice-vuelta-hélice de represores bacterianos de la familia GntR, lo que sugiere que su producto es un represor. El segundo gen *ansP* muestra identidad con una L-asparagina permeasa de *Salmonella enterica* (Jennings et al, 1995). El gen *asnA* codifica para la L-asparaginasa aunque su secuencia no presentó identidad con proteínas de función conocida. Experimentos de geles nativos revelados por actividad *in situ* revelaron que el producto de este gen tiene actividad de asparaginasa. Por último el gen *asnB* presentó identidad con la aspartasa de *Pseudomonas fluorescens* (Takagi et, al, 1996).

Experimentos de RT-PCR revelaron que la expresión de *ansP*, *ansA* y *ansB* está organizada como operón de 7 Kb y que *asnR* se expresa de manera independiente. Además se comprobó mediante experimentos de represión catabólica que el operón *ans* esta regulado negativamente por la fuente de carbono (Ortuño-Oleay Durán-Vargas, 2000) (fig 4).

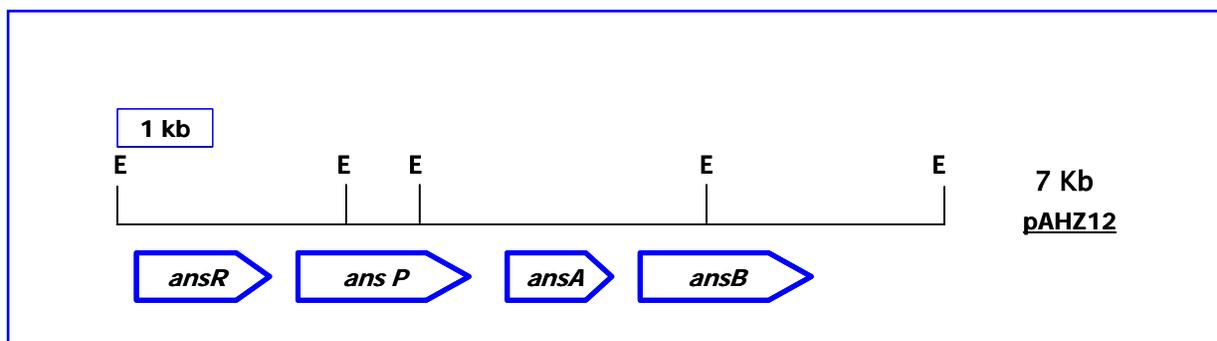


Fig. 4. Arreglo de genes del operón de la asparaginasa II de *R. etli*.

En *B. subtilis* se ha observado que los genes de la asparaginasa y aspartasa se encuentran organizados en un operón lo que muy probablemente le permite mantener los niveles de aspartato y asparagina intracelular (Sun y Setlow, 1991). En *R. etli* este operón se induce para utilizar a la asparagina como fuente de carbono y nitrógeno. Ambos microorganismos presentan un represor río arriba del operón que regula negativamente su transcripción (Sun y Setlow, 1993).

Mediante el análisis de la secuencia de los 1116 nucleótidos del gen *ansA* se dedujo la secuencia de aminoácidos. Se realizó el alineamiento de la secuencia deducida con las secuencias reportadas para otras enzimas con actividad de asparaginasa. Este análisis mostró que la asparaginasa II de *R. etli* parece no estar relacionada con otras asparaginasas microbianas ni con la de otras rhizobiaceas (Cuadro 2). Esto sugiere que el gen *ansA* posee una historia evolutiva diferente a la asparaginasas de otros microorganismos. La ausencia de similitud entre la asparaginasa II de *R. etli* y otros organismos sugiere además, la existencia de mecanismos diferentes para la degradación de la asparagina (Borek y Jalkóski, 2001). La comparación de las secuencias de las asparaginasas de *E. coli* y *E. chrysantemii*, que son enzimas utilizadas en el tratamiento contra la LLA, respecto a la secuencia de la asparaginasa II de *R. etli*, muestran homología del 12 y 10 % respectivamente.

CUADRO 2. IDENTIDAD EN LA SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DEDUCIDAS DE LA ASPARAGINASA DE MICROORGANISMOS EN RELACIÓN A LA ASPARAGINASA II DE *R. etli*.

BACTERIA		RHIZOBIACEAS	
ORGANISMO	IDENTIDAD (%)	ORGANISMO	IDENTIDAD (%)
<i>E.coli</i>	12	<i>Mesorhizobium sp.</i>	35
<i>E. chrysantemii</i>	10	<i>Brucella melitensis</i>	37
<i>S. cerevisiae</i>	12	<i>B. suis</i>	26
<i>B. subtullis</i>	9	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	24
<i>W. succinogenes</i>	10	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	27
<i>Thermus thermophilus</i>	38		

Identidad de los residuos de aminoácidos comparadas con el programa DNAMAN a partir de las secuencia de aminoácidos obtenidas del sitio del Nacional Center for Biotechnology Information (<http://NCBI.nlm.nih.gov/>).

La baja homología encontrada entre las secuencias del gen *ansA* y la secuencia de las asparaginasas utilizadas como agente antineoplásico, sugiere una diferente inmunogenicidad de la asparaginasa II de *Rhizobium etli*, por lo que se podría utilizar como alternativa en el tratamiento de la LLA. La determinación de la afinidad de la asparaginasa II de *R. etli* por asparagina así como sus características bioquímicas nos permitirán conocer a la enzima, mientras que estudios de inmunogenicidad nos permitirán proponerla como alternativa terapéutica.

OBJETIVOS

GENERAL.

- ◆ Purificar y caracterizar a la asparaginasa II de *Rhizobium etli*.

PARTICULARES.

- ◆ Clonación del gen *ansA* de la asparaginasa II de *Rhizobium etli* en el vector de expresión pTrcHis A.
- ◆ Sobreexpresión y purificación de la proteína recombinante His₆ -ansa II.
- ◆ Determinación de los parámetros bioquímicos y fisicoquímicos de la proteína recombinante His₆ - ansa II.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

El diseño experimental se encuentra dividido en tres fases:

PRIMERA FASE: CLONACIÓN DE LA ASPARAGINASA II DE *Rhizobium etli* EN EL VECTOR

p TrcHis A.

- El primer paso para la clonación del gen *asnA* que codifica para la asparaginasa II de *R. etli* en el plásmido pTrcHis A, fue el diseño de oligonucleótidos, los cuales se encuentran flanqueados con las secuencias reconocidas por las enzimas de restricción *Bam*H1 (5´) y *Eco*R1 (3´) como indica el cuadro 18 .
- A los oligonucleótidos se les cuantificó espectrofotométricamente la concentración a A_{280nm} de una dilución 1: 100 en agua desionizada estéril.
- Para obtener una gran cantidad del gen *asnA* se realizó la PCR con los oligonucleótidos descritos anteriormente empleando el plásmido pAHZ12 como templado (Padmakumar y Varandarajan 2003), como indican los cuadros 20 y 21. El tamaño del fragmento de DNA amplificado fue de 1.1 Kb.
- Para realizar la clonación, inicialmente se aisló y purificó el plásmido pTrcHis A (4.4 Kb) por lisis alcalina (Ausebel *et. al.*, 1994), así como el producto de la PCR. Ambas purificaciones se realizaron con membranas de sílica a través de una columna Qiagen según el procedimiento del Kit Rapid PCR Purification Systems (Marligen Bioscience).

- Posteriormente, se realizó la digestión tanto del plásmido pTrcHis A como del producto de la PCR con las enzimas de restricción *Bam*H1 y *Eco*R1 (GIBCO BRL), y se ligaron con T4 DNA ligasa (Ausebel *et. al.*, 1994).
- Con el producto de esa ligación se transformaron células competentes de *E. coli* JM109 y se seleccionaron las transformantes por α -complementación con IPTG-XGal, además de su resistencia a Amp (Invitrogen).
- Finalmente se obtuvieron 6 clonas positivas a las cuales se les verificó por análisis de restricción la construcción genética (Ausebel *et. al.*, 1994). La construcción se denominó *pANSA* y la proteína recombinante se llama His₆ - ansa II.
- A las clonas positivas también se les comprobó el fenotipo por medio de cuantificación de la actividad de asparaginasa por producción de amonio (Chaney y Marbach, 1962). Se eligió la cepa con mayor actividad específica para continuar con el proceso de sobreexpresión.
- Para realizar la sobreexpresión de la proteína recombinante His₆- ansa II fue necesario realizar extracción del plásmido *pANSA* y purificarlo para transformar células de *E. coli* BL21 (DE3) (Stratagene), las cuales fueron previamente transformadas con el plásmido pPRIL (Ausebel *et. al.*, 1994).
- Se confirmó el fenotipo de la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) pPRIL *pANSA* por medio de su resistencia a Amp y Cm.

SEGUNDA FASE: PURIFICACIÓN DE His₆ – ansa II

- Para realizar la purificación de la proteína recombinante His₆ – ansa II se realizó inicialmente un ensayo control de inducción en la cepa *E. coli* BL21 (DE3) pPRIL pANSA, así como de las cepas control *E. coli* BL21 (DE3) pTrcHis A, pPRIL, y pANSA.
- La inducción de la proteína His₆ – ansa II se realizó en medio LB con IPTG 0.5 mM, incubándose toda la noche. Las células del cultivo inducido se lisaron por tratamiento con lizozima, se rompieron las células por sonicación y se centrifugó el cultivo. Posteriormente el volumen total del sobrenadante (80 ml) se filtró a través de membranas de 0.22 μm.
- Para purificar la proteína recombinante se realizó cromatografía de afinidad con una columna Hi-Trap Chelating HP de 5 ml (Amersham Biosciences) a la cual se aplicó el extracto proteínico y se realizaron lavados con diferentes concentraciones de Imidazol. Finalmente, se eluyó la proteína His₆ – ansa II con Imidazol 0.5 M (Scopes, 1982).
- Para conocer la pureza de la proteína en las eluciones obtenidas se corrió un gel desnaturalizante SDS–PAGE al 10 %. (Makowski and Ramsby, 1997). Se juntaron las eluciones 3, 4,5 y 6 para hacer un stock de proteína.
- Para remover el Imidazol, el stock de proteína se dializó contra buffer de fosfatos y glicerol al 20 % durante 24 hrs a 4 °C, con cambios constantes de la misma solución.
- La proteína se almacenó con glicerol al 20% como estabilizador y se preservó a –70 °C.
- Se determinó la actividad específica de la proteína purificada por producción de amonio, además se determinó el factor de purificación y el rendimiento de la proteína recombinante His₆ – ansa II.

- Ya con la proteína pura, se determinó su peso molecular en condiciones nativas y desnaturalizantes, en geles de poliacrilamida NATIVO – PAGE y SDS – PAGE, respectivamente. Los datos de la masa molecular se obtuvieron por la movilidad electroforética relativa de la proteína recombinante comparada con marcadores de masa molecular conocida.

TERCERA FASE: CARACTERIZACIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE His₆ – ansa II

- Para la caracterización de los parámetros bioquímicos de la proteína recombinante His₆ – ansa II todos los ensayos se realizaron por triplicado. Primero se determinó la concentración óptima de proteína para la evaluación de actividad, la cual fue de 0.12 µg/ml. La actividad específica se determinó cuantificando la producción de amonio, y representada en UI como la cantidad de enzima necesaria para producir 1 nmoles de NH₄/min/mg de proteína a 37 °C.
- Se determinó la estabilidad en gradiente de temperatura evaluando la actividad enzimática de 25 a 60 °C con intervalos de 5 °C en amortiguador de fosfatos a pH 7.6. Además, se determinó la estabilidad en gradiente de pH probando el rango de 5 a 11 con intervalos de 0.5 unidades de pH a 37 °C. Los amortiguadores probados se encuentran en el cuadro 24 (Huerta-Saquero, *et al.*, 2001). Para ambos ensayos la concentración de asn fue de 10 mM.
- Los parámetros cinéticos Km y Vmax fueron determinados utilizando concentraciones de asn de 1 a 40 mM con intervalos de 2.5 mM, con amortiguador de fosfatos pH 9 a 37 °C. (Lenhinger, 1993). Se empleó el método de Lineweaver – BurK para determinar dichos parámetros.
- Para determinar la especificidad de la proteína His₆ –ansa II por su sustrato se probaron compuestos análogos de la ans tales como β-aspartil hidroxamato, D-asn, D-gln, L-gln, L-ácido aspártico en concentración 10 mM con amortiguador de fosfatos pH 9. Además, se determinó si estos compuestos producen inhibición en la actividad de asparaginasa, realizando

ensayos en presencia de los mismos en combinación con asn, ambos a 10 mM (Kitto *et. al.*, 1979).

- Debido a que la asparaginasa fue inhibida por sus productos, se determinaron las constantes de inhibición de cada uno de ellos, por medio de la combinación de soluciones 5, 10 y 15 mM de ácido aspártico o amonio con asn 5, 10, 15 y 20 mM en buffer de fosfatos pH 9 a 37 °C (Pritsa y Kiriakidis, 2001).
- También determinamos si la proteína recombinante es inhibida por cationes divalentes. Probando Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} y Zn^{2+} a concentraciones de 2 y 4 mM en amortiguador de carbonatos pH 9 con asn 10 mM (Manna *et. al.*, 1995).
- Finalmente se determinó el punto isoeléctrico por migración relativa de la proteína en un gel SDS de Isoelectroenfoque (IEF) de acrilamida homogénea al 5% con gradiente de pH de 3 - 9 generado por anfolinas Pharmalyte (Pharmacia).

RESULTADOS**I CLONACIÓN DEL GEN *ansA* QUE CODIFICA PARA LA ASPARAGINASA II DE *R. etli* EN EL VECTOR DE EXPRESIÓN pTrcHis A.**

Con el objeto de obtener cantidades suficientes de asparaginasa II de *R. etli* para realizar su estudio bioquímico, se decidió clonar el gen estructural *ansA* en el vector de expresión pTrcHis A.

El gen *ansA* se amplificó mediante la reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Se utilizó como templado el plásmido pAHZ12, donde se encuentra el operón de la asparaginasa. El plásmido fue previamente aislado de la cepa de *E. coli* HB101. El producto de PCR se corrió en gel de agarosa al 1% y se comprobó que el producto de la PCR era del tamaño esperado (1.1 Kb) (fig. 5).

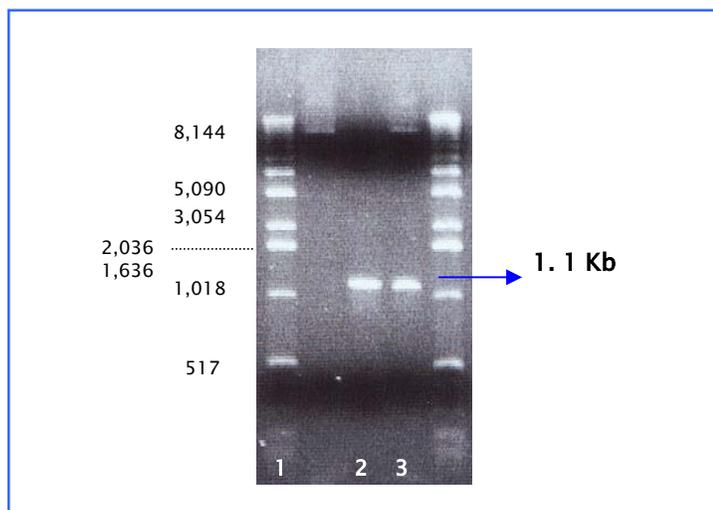


FIGURA 5. Gel de agarosa al 1 %. Los carriles 2 y 3 muestran la banda de 1.1 Kb correspondiente al gen *ansA* obtenido de la PCR. El carril 1 indica el marcador de peso molecular.

I.1 CONSTRUCCIÓN GENÉTICA.

Para lograr la clonación del gen *ansA* en el vector pTrcHis A se realizó la doble digestión del producto de la PCR así como del plásmido pTrcHis A y se ligaron. Se transformaron células competentes (CC) de *E. coli* JM109. De las clonas positivas se aislaron 150 de cada dilución.

Finalmente se obtuvieron sólo 6 clonas positivas a las cuales se les realizó análisis de restricción, para determinar que contuvieran el inserto (Fig. 6).

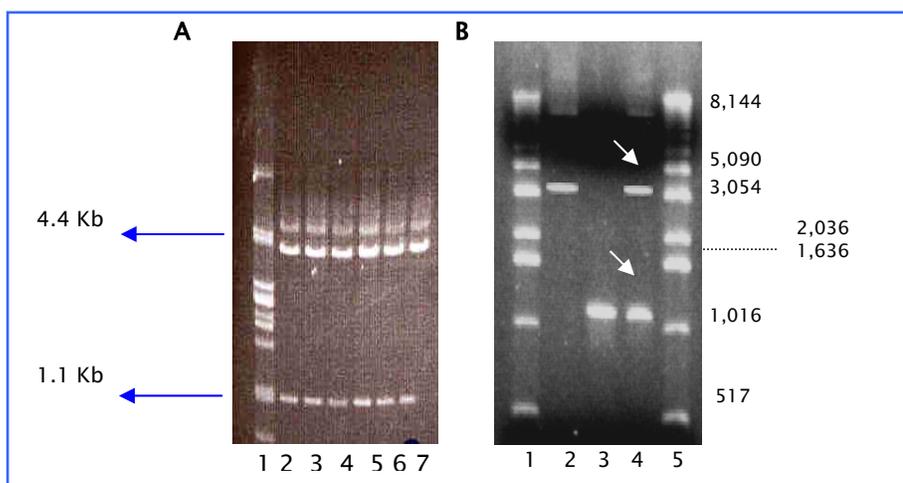


FIGURA 6. Análisis de restricción de las construcciones candidatas con las enzimas *Bam*H1 y *Eco*R1 en gel de agarosa al 1 % . A. Los carriles 2 - 7 muestran las bandas de 1.1 Kb del inserto del gen *ansA* y 4.4 Kb correspondiente al vector pTrcHis A. El carril 1 indica el marcador de peso molecular. B. Se muestra la construcción de la clona seleccionada (*pANSA*). En el carril 2 se observa el plásmido *pANSA*. Carril 3, producto de la PCR. Carril 4 doble digestión de *pANSA*, las flechas indican el vector e inserto. El carril 1 y 5 es marcador de peso molecular.

Para seleccionar sólo una de las clonas, fue necesario determinar la actividad específica del extracto celular. Como muestra la figura 7, la actividad específica es muy similar entre ellas, por lo que elegimos a la clona No. 4 para continuar con el proceso de sobreexpresión de la proteína.

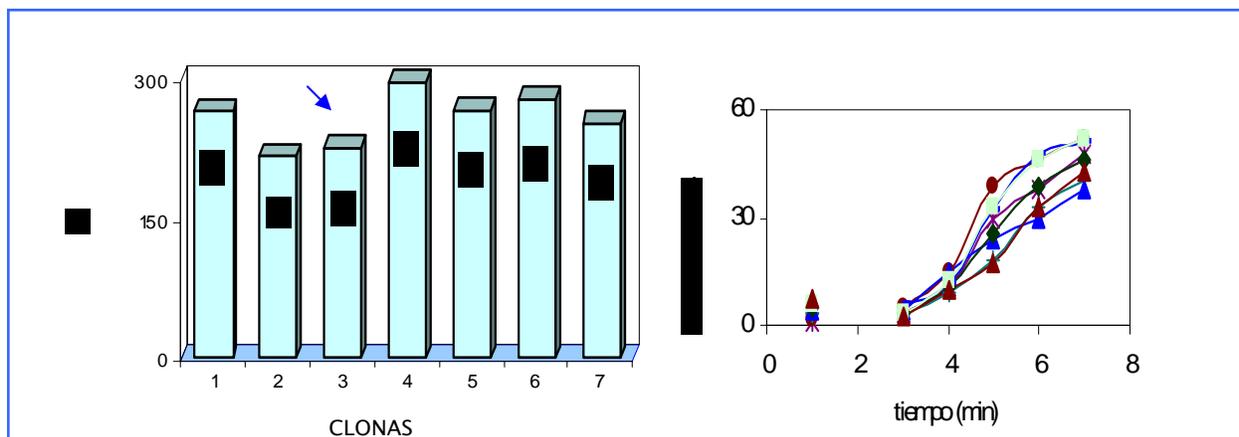


FIGURA 7. Cinéticas de actividad de las clonas seleccionadas.

1.2. RETRANSFORMACIÓN EN *E. coli* BL21 (DE3) pPRIL.

Durante la traducción de los RNA mensajeros en *E. coli* existen codones que tienen una frecuencia de uso baja y que causan problemas durante la traducción, sobre todo cuando se localizan hacia la región 5´ del mensajero. Según Rosenberg *et. al.*, (1993), la presencia de codones de uso con baja frecuencia de manera consecutiva inhibe la traducción, pudiendo ser restaurado de dos maneras: supliendo la deficiencia en la concentración intracelular de los tRNA´s para los codones, y por otro lado cambiando los codones de uso bajo por codones de frecuencia de uso alto (Goldman *et. al.*, 1995; Kane, 1995).

Analizando la secuencia del gen *ansA* que codifica para la asparaginasa II de *R. etli* contra la tabla de uso de codones del genoma de *E. coli* se pudo observar que existen en la secuencia codones para los aminoácidos Arginina, Prolina, Leucina e Isoleucina que *E. coli* utiliza con una frecuencia menor del 3%. Por el análisis obtenido, observamos que hacia el extremo 5´ se localizan estos codones que posiblemente afectarán la expresión de la proteína recombinante His₆ – ansA II (<http://pegasus.uthct.edu/ResUTHCT/Investigators/Sblack/codonuse.html>).

Por lo anterior decidimos utilizar la cepa *E. coli* BL21 (DE3) con el plásmido pPRIL, esta cepa es comúnmente utilizada para la sobreexpresión de proteínas a gran escala de forma rápida y económica ya que posee mutación en la proteasa periplásmica (OmpT) que le permite sobreexpresar proteínas heterólogas sin degradarlas durante su expresión (Donahue y Bebee, 1999). El plásmido pPRIL incrementa la poza intracelular de los tRNA's para los aminoácidos Arginina, Prolina, Leucina e Isoleucina que en *E. coli* se presentan en niveles muy bajos.

Realizamos los experimentos de la expresión de la proteína recombinante His6 - ansa II en presencia de pPRIL. El gel SDS - PAGE al 10 %. La figura 8 muestra los niveles de expresión obtenidos al incrementar la poza de los tRNA's. Esto mismo se comprobó cuantificando la actividad específica de asparaginasa II. Como se observa en la figura 9, las cepas BL21 (DE3) pTrcHis A y pPRIL muestran actividad de 390 y 217UI respectivamente, la cual es baja en comparación con la cepa BL21 (DE3) pANSA (783.8 nmoles NH₄/min/mgP), sin embargo, la cepa que posee el plásmido pPRIL, BL21 (DE3) pPRIL pANSA presentó mayor actividad enzimática (1109 UI).

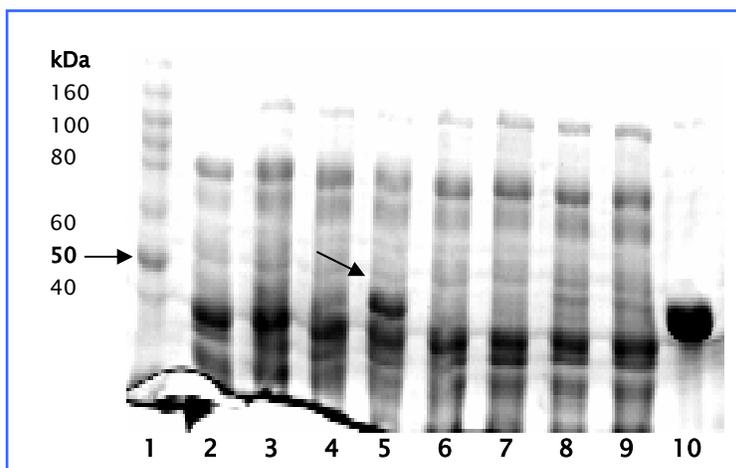


FIGURA 8. Niveles de inducción de las cepas control y experimentales en gel SDS - PAGE al 10%. En el carril 5 se observa mayor inducción en la cepa con el plásmido pPRIL en comparación con las demás, después de inducir las por 12 horas (30 µg de proteína por carril). Carril 1. Marcador de peso molecular. Carril 2. BL21 pANSA. Carril 3. pANSA IPTG. Carril 4. pANSA pPRIL. Carril 5. pANSA pPRIL IPTG. Carril 6. pTrcHis A. Carril 7. pTrcHis A IPTG. Carril 8. pPRIL Carril 9. pPRIL IPTG. Carril 10. Control Asparaginasa II de *R. etli* pura.

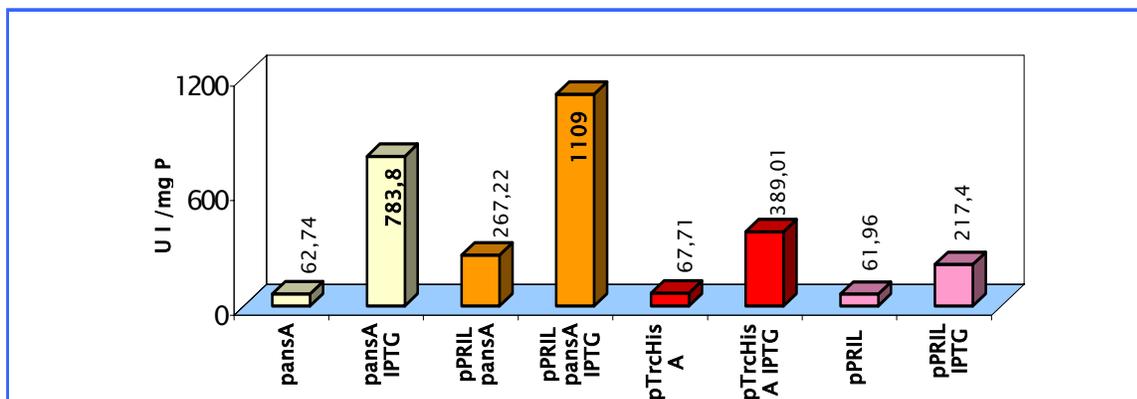


FIGURA 9. Actividad específica de His₆ – ansa II. Ensayo con inducción de IPTG 0.5 mM a partir de 0.4 D.O a A₅₉₅, incubación por 12 hrs a 37 °C. Ensayo realizado con 20 µg de proteína total.

Finalmente se seleccionó la cepa para la sobreexpresión de la proteína recombinante, que además posee el gen *ansA*, a la cual le nombramos *E. coli* BL21 (DE3) pPRIL *pANSA*. En el cuadro 3 se observa la secuencia de aminoácidos de la proteína recombinante His₆ – ansa II con la proteína líder y la cola de histidinas adicionadas por el plásmido pTrcHis A (ANEXO1).

CUADRO 3. SECUENCIA DE RESIDUOS DE AMINOÁCIDOS DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE His₆ – ansa II.

```

MGGSHHHHHH GMASMTGGQQ MGRDLYDDDD KDRWGSMERE
MTPSEDFVVT DRGGIVENSH RVHAAVVDK GRLLYALGNP
TRMTLARSAA KPAQALAILE TEGVAGYGFD DADIALMCAS
HSSEDRHIAR TRAMLSKIKK EEADLRCGGH PSLSEMVNRS
WIKQDFIPTA VCSNCSGKHV GMLAGARAIG AGTDGYHLPD
HPMQGRVKRT VAELCDLDAG DVEWGTDCN LPTPAFPLDR
LGRIYAKLAS AADGSDAGEG QSTRCAALAH IFRAMARHPE
MVAGEGRYCT MLMRAFDGAL VGKLGADASY AIGVRASDAT
RQLGTDGALG ISVKIEDGNL EMLYAVVTEL LERLGIGSPD
VRSQLASFHH PQRVNTMGVT TGGVSFPFKL RGSKSNVDDP
RLAAVAR*

```

Cola de histidinas: letras en negrita y subrayadas; péptido líder: letras cursivas y resaltadas.

I I. PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE His₆ – ansa II.

La inducción de la proteína recombinante se realizó adicionando IPTG al medio de cultivo LB, las células se incubaron durante 12 hrs. La purificación de la proteína recombinante His₆- ansa II se realizó mediante cromatografía de afinidad en una columna Hi-Trap Chelating (Anexo 2). La proteína fue eluída con Imidazol 0.5 M. y las fracciones recolectadas en un volumen de 1 ml. Se determinó la concentración de proteína a cada una de ellas por el método de Bradford (cuadro 4) y se observó la pureza de la proteína en gel SDS – PAGE (fig. 10).

CUADRO 4. CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA TOTAL PURIFICADA POR CROMATOGRFÍA DE AFINIDAD.

ELUSIÓN	CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g} / \text{ml}$)	LAVADO (mM Imidazol)	CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g} / \text{ml}$)
3	0.92	10	1.15
4	1.08	40	0.12
5	1.05	60	0.1
6	0.913	100	0.15
7	0.427	Ext. crudo	2.5

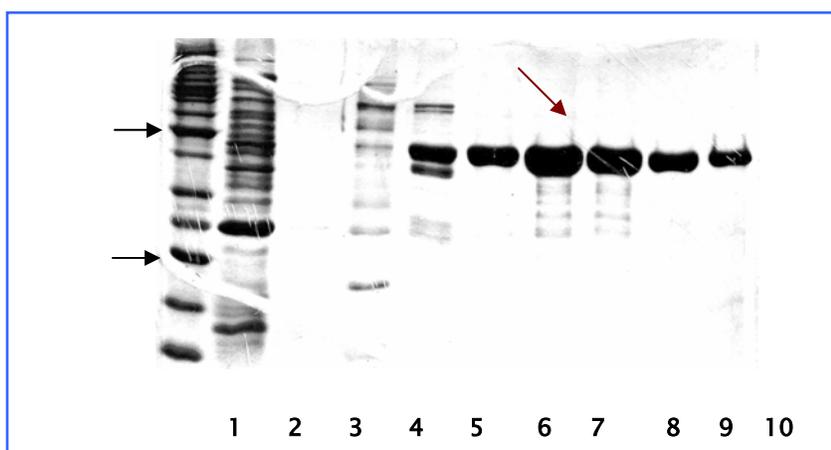


FIGURA 10. Gel SDS – PAGE al 10 % con elusiones de la columna y lavados de imidazol (carriles 5 – 10). Se observa que los lavados eliminan las proteínas unidas inespecíficamente a la columna (carriles 2 – 4) (20 μg por carril).

Debido a la elevada concentración de la proteína y a su pureza, se eligieron eluciones 3, 4, 5 y 6 (carriles 6 - 9) para dializarlas juntas y hacer un stock de proteína.

11.1 MASA MOLECULAR DE His₆ - ansa II POR MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA.

Se observó en gel NATIVO - PAGE y SDS - PAGE la movilidad relativa (M_r) de la proteína dializada para determinar su peso molecular nativo y de sus subunidades, respectivamente (fig. 11).

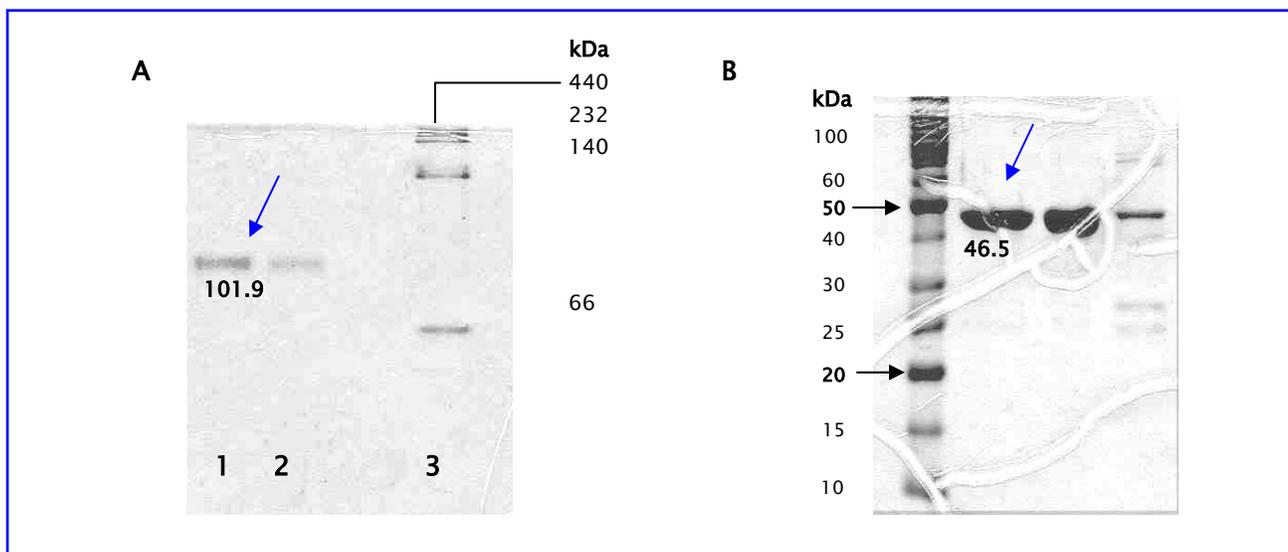


FIGURA 11. Muestra la migración de la proteína His₆ - ansa II (10 μ g por carril) . A. Gel NATIVO - PAGE, que indica la masa molecular de la proteína en 101.9 kDa en condiciones nativas. Carril 1. marcador de peso molecular y B. SDS - PAGE, indica la masa molecular de las subunidades de 46.5 kDa que conforman a la enzima activa. Carril 3. Marcador de peso molecular.

En el gel NATIVO-PAGE podemos observar una banda de aproximadamente 101.9 kD (fig. 11 A), y en el gel SDS-PAGE se observa una sola banda de aproximadamente 46.5 kD (Fig. 11 B). Esto sugiere que la enzima activa está conformada por un homodímero.

Las masas moleculares de las bandas correspondientes a His₆ - ansa II se calcularon en gel NATIVO-PAGE y SDS-PAGE al 10 %, comparando la movilidad electroforética de la proteína en comparación con los marcadores de peso molecular (Fig. 12 A y B).

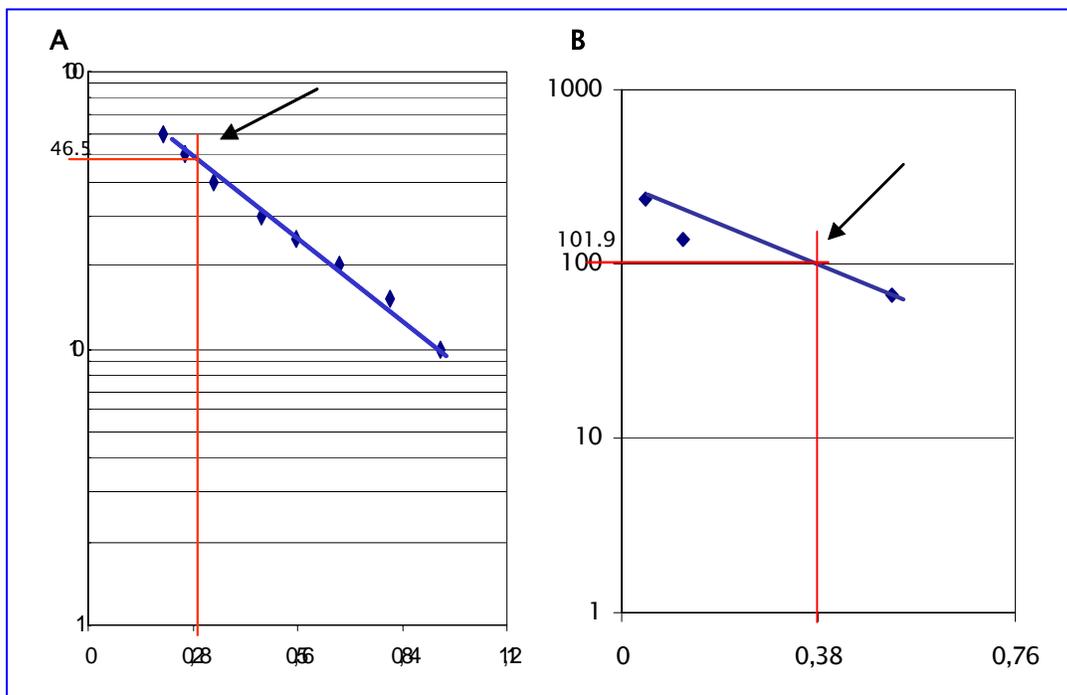


FIGURA 12. Movilidad electroforética relativa de His₆ – ansa II mostrada por la línea de intersección. A. Gel NATIVO – PAGE y B. Gel SDS – PAGE. Se extrapoló la distancia de migración recorrida por la proteína.

El rendimiento total de la proteína, así como el porcentaje de purificación se muestra en el cuadro 5, en el que se considera la concentración de proteína inicial y la concentración de la proteína purificada luego de los procesos de purificación y diálisis.

CUADRO 5. RENDIMIENTO Y PORCENTAJE DE PURIFICACIÓN.

TRATAMIENTO	PROTEÍNA TOTAL (mg)	ACTIVIDAD TOTAL (U)	ACTIVIDAD ESPECÍFICA (U/mg)	F *	RENDIMIENTO (%)
Extracto crudo	100	110 900	1 109	1	100
His ₆ – ansa II	5.4	108 000	20 000	28	97

* Factor de purificación.

La proteína se almacenó a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, Observando que la enzima requiere glicerol al 20% para estabilizarse, ya que en ensayos de actividad con enzima criopreservada sin glicerol, la actividad disminuye hasta tres veces (datos no mostrados). Un dato importante fue que después de 5 meses almacenada a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ no se afectó su actividad enzimática, por lo que se pudo descongelar varias veces o incluso guardarse a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, manteniéndose muy estable.

III. CARACTERIZACIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE His- ansa II.

A. PARÁMETROS BIOQUÍMICOS.

Para caracterizar los parámetros bioquímicos de la enzima, la utilizamos en todos los ensayos a una concentración de $0.12\text{ }\mu\text{g/ml}$. Esta concentración está optimizada luego de realizar cinéticas de actividad enzimática, probando las concentraciones de 1.2, 0.48, 0.24, 0.12, 0.06, $0.03\text{ }\mu\text{g}$ de proteína purificada (fig. 13). La proteína empleada en cada ensayo se diluyó justo antes de determinar la actividad enzimática.

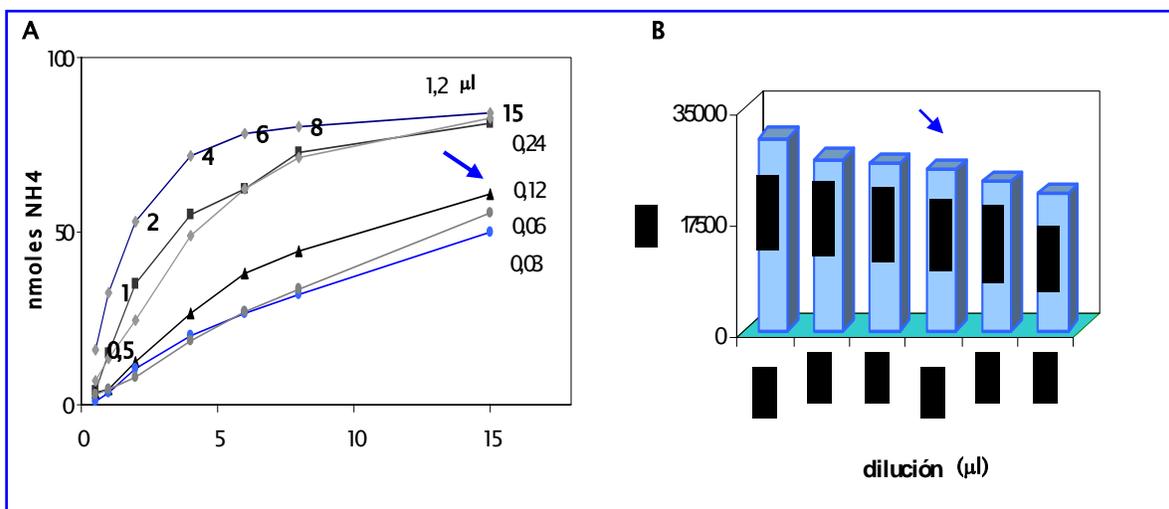


FIGURA. 13 A. Cinéticas de actividad con proteína purificada a diferentes concentraciones y B. Actividad específica de cada concentración. Las flechas indican la concentración seleccionada.

Decidimos utilizar la concentración de 0.12 $\mu\text{g/ml}$ debido a que la actividad fue media y nos permitió ver modificaciones en la cinética con respecto a los parámetros a evaluar. Este ensayo se realizó en buffer de reacción pH 7.5, por lo que las actividades específicas son bajas. Posteriormente se ajustaría el valor de pH a utilizar.

A.1. ESTABILIDAD EN GRADIENTE DE TEMPERATURA Y pH.

La proteína His₆ – ansa II presentó mayor estabilidad a una temperatura de 50 °C (80 000 U) (fig. 14), a 60 °C la enzima pierde el 80 % de la actividad.

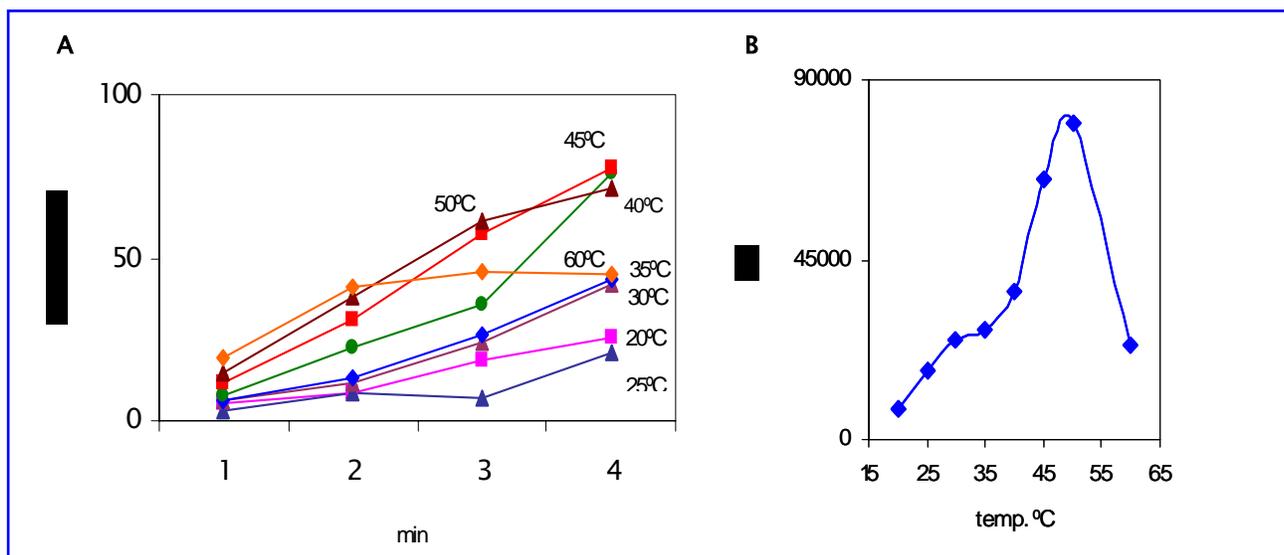


FIGURA 14. Gradiente de temperatura. A. Cinética de actividad de His₆ – ansa II a diferentes temperaturas. B. Estabilidad de His₆ – ansa II, la curva representa el incremento de la actividad conforme aumenta la temperatura.

Para comprobar que lo observado en los gráficos era la estabilidad enzimática y no saturación enzimática, realizamos un experimento de termoestabilidad. La enzima se incubó a 50 °C por periodos de 5, 10, 20 y 30 min en buffer fosfatos con asn 10 mM.

Observamos que mantener la enzima a 50 °C provoca que pierda gradualmente su actividad hasta en un 83 % después de 30 min. como se observa en el cuadro 6. Debido a lo anterior,

decidimos continuar con la caracterización enzimática a 37 °C, aunque no es la temperatura donde hay mayor actividad, si es una temperatura a la cual la enzima se mantiene activa. Hacer los ensayos a 37 °C garantizó que los experimentos fueran reproducibles y los resultados confiables durante periodos largos de incubación.

CUADRO 6. TERMOESTABILIDAD DE His₆ – ansa II.

INCUBACIÓN (min)	ACT. ESP (UI)	ACTIVIDAD %	PÉRDIDA %
0	206 000	100	0
5	200 000	97	3
10	194 676	94	6
20	81 638	40	60
30	34 575	17	83

Con respecto a la estabilidad de la proteína His₆ – ansa II en gradiente de pH encontramos que ésta se encuentra en pH 9 con el buffer de fosfatos (137 000 U) (Fig. 15). Observando que a pH fisiológico (6.5 a 7.2) la estabilidad enzimática se encuentra cuatro veces por debajo del valor obtenido con pH 9.

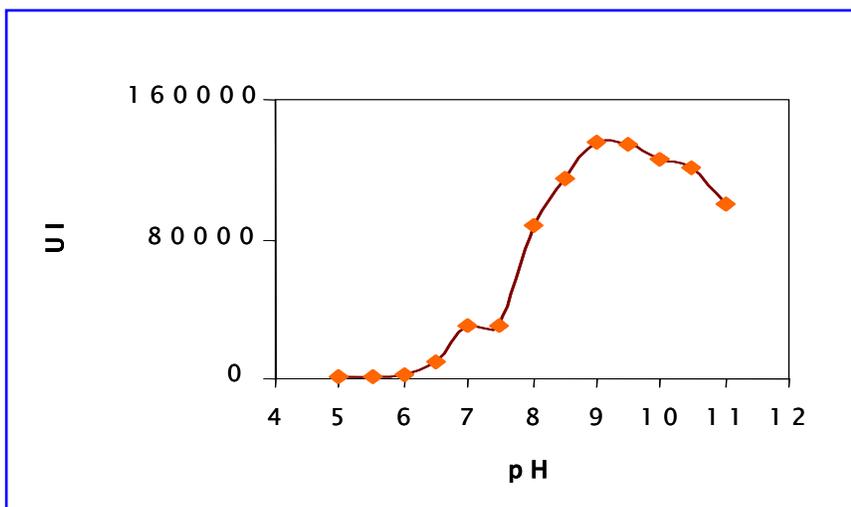


FIGURA 15. Estabilidad de His₆ – ansa II en gradiente de pH.

Es importante mencionar que la actividad específica de His₆ – ansa II se incrementó en mayor proporción en presencia de pH básico. Esto sugiere que el pH básico favorece que el sitio activo se encuentre más disponible al sustrato que en pH ácido, mejorando la catálisis, casi independientemente de la temperatura. Para comprobar si lo anterior era correcto, determinamos la actividad específica en buffer pH 9 a diferentes temperaturas (27 °C, 37 °C y 50 °C).

Como indica la figura 16, no hay diferencia significativa en la producción de amonio de His₆ – ansa II en las diferentes temperaturas probadas, pero la actividad específica, se ve disminuida en un 15 % y 22 % a 37 °C y a 27 °C respectivamente.

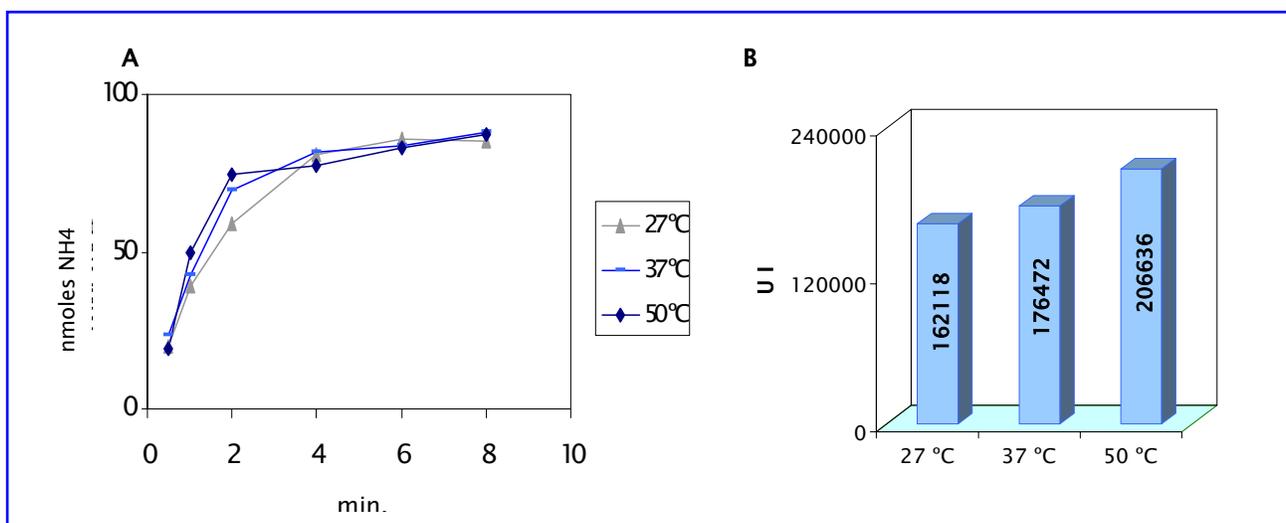


FIGURA 16. Análisis de la actividad específica de His₆ – ansa II a diferentes temperaturas y en presencia del buffer de reacción a pH9. A. cinéticas de producción de amonio a diferente temperatura y B. actividad específica de His₆ – ansa II.

De los resultados de estabilidad en temperatura obtuvimos que a 50 °C la actividad de His₆ – ansa II fue de 80 X 10³ UI (Fig. 14) en comparación con la actividad de la enzima en pH 9 que fue de 206 X 10³ UI. Estos datos sugieren que el pH incrementa la actividad casi

independientemente de la temperatura. Por los resultados observados decidimos utilizar el buffer de fosfatos pH 9 e incubar las reacciones a 37 °C en los ensayos para caracterizar a His₆ - ansa II.

A.2. PARÁMETROS CINÉTICOS.

La proteína recombinante His₆ - ansa II mostró un comportamiento claramente Michaeliano. Los parámetros cinéticos de la proteína se obtuvieron a partir del gráfico del doble recíproco (Lineweaver - Burk) (Fig. 17). Los valores de Km y Vmax obtenidos se resumen en el cuadro 7.

CUADRO 7. PARÁMETROS CINÉTICOS DE His₆ - ansa II.

Km	VMax
10 mM	250 000 nmoles NH ₄ /min/mgP

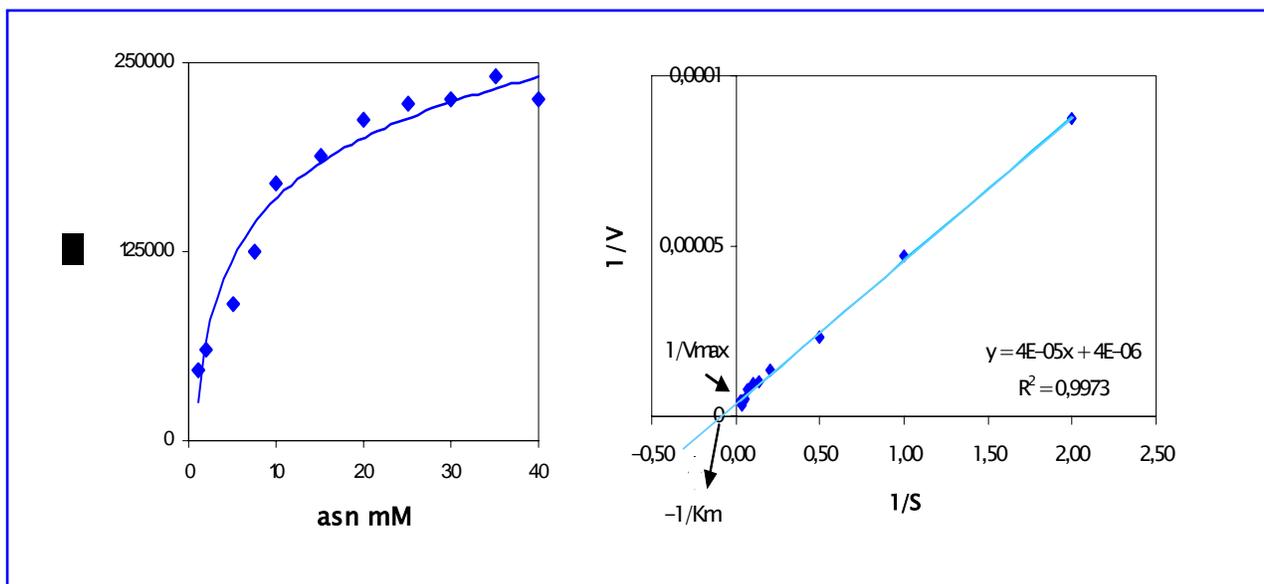


FIGURA 17. Comportamiento cinético de His₆ - ansa II. A. Gráfica de Michaelis-Menten donde se observa un comportamiento enzimático de tipo Michaeliano y B. Gráfica de doble recíproco (Lineweaver - Burk) para obtener los parámetros cinéticos.

La Km que presentó la enzima, muestra que la afinidad de His₆ – ansa II por el sustrato es baja en comparación con las asparaginasas empleadas para el tratamiento contra la LLA (Cedar y Schwartz, 1968; Callow *et. al.*, 1971), así como para otras asparaginasas reportadas. La asparaginasa de *B. subtilis* mostró poseer una Km de 55 mM, sin embargo no ha sido probada contra algún linaje celular canceroso para determinar su actividad antiproliferativa (Sun y Setlow, 1991). Esto sugiere, que la asparaginasa II de *R. etli* no sólo es atípica por la secuencia nucleotídica del gen *ansA* sino además por sus parámetros cinéticos.

A.3. ESPECIFICIDAD DE His₆ – ansa II POR ASPARAGINA.

De los ensayos con compuestos análogos de la asn probados para determinar la especificidad (D–asparagina, Ácido aspártico, D–glutamina, L–glutamina y β–aspartil hidroxamato), no observamos hidrólisis de ninguno de ellos, lo que muestra que His₆ – ansa II es altamente específica a su sustrato asparagina. El hecho de no presentar actividad catalítica por glutamina le confiere ventaja a la asparaginasa II de *R. etli* sobre otras asparaginasas, favoreciendo su utilidad como agente coadyuvante contra la LLA.

Los mismos análogos de la asn y los productos de la reacción catalizada por la asparaginasa fueron empleados para conocer si la presencia de estos modifican la actividad enzimática en combinación con asn 10 mM. En la figura 18 se observa que todos los compuestos probados inhiben a la enzima, excepto la glutamina en concentración 10 mM que aparentemente activa en un 16 % a la enzima. Los análogos D–asparagina y β–aspartil hidroxamato reducen la actividad enzimática independientemente de la concentración (5 y 10 mM).

Los productos de la catálisis, amonio y ácido aspártico, inhiben a la enzima. A 5 mM inhiben 8 % y 38 % respectivamente. Mientras que en la concentración de 10 mM inhiben la actividad 64 % y 69 % , respectivamente.

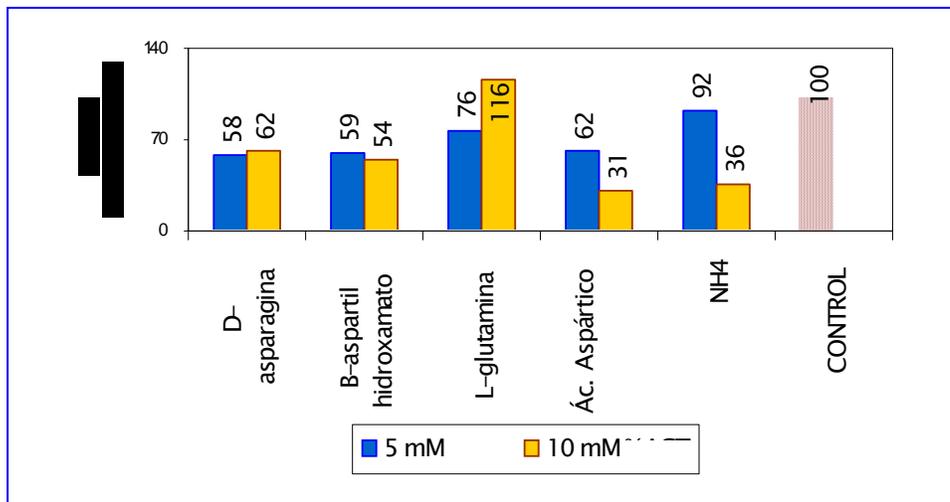


Figura 18. Porcentaje de la actividad específica de His₆ – ansa II en presencia de análogos de asn y productos de la catálisis al 5 y 10 mM disueltos en buffer de reacción en combinación con asn 10 mM.

A.4. INHIBICIÓN POR PRODUCTOS DE LA ASPARAGINASA.

Se determinó la actividad específica de la enzima con diferentes concentraciones de producto. Se graficaron las cinéticas de actividad por medio de las cuales se observó la inhibición en la actividad específica de la enzima (Fig 19 A y 20 A) y se determinó la constante de inhibición de cada uno de los productos por medio del gráfico del doble recíproco (Lineweaver – Burk) (Fig. 19B y 20B), datos resumidos en el cuadro 8.

En las figuras 19B y 20B se puede observar que el amonio inhibe no competitivamente, mientras que el ácido aspártico lo hace competitivamente. La inhibición por ácido aspártico sugiere que este producto puede competir por el sitio activo de la enzima ocupando el lugar de la asparagina deteniendo la reacción enzimática (Lenhinger, 1993), esto se puede observar cuantitativamente, pues el valor de Km aparentemente crece al aumentar la concentración de inhibidor. La constante de inhibición (K_i) de aspartato se calculó con un regráfico del valor de la Km aparente de cada concentración de inhibidor contra su correspondiente concentración de inhibidor. La K_i corresponde al valor absoluto de la intersección de la recta con el eje de las abcisas (Segel, 1975).

El producto amonio se une en un lugar distinto al sitio activo y aunque permite la unión por la asparagina la enzima se inactiva (Lenhinger, 1993). Esto se puede observar cuantitativamente, pues disminuye el valor de V_{max} aparente en presencia de amonio. Se determinó la K_i por medio de un regráfico del valor de la V_{max} aparente de cada concentración de inhibidor contra su correspondiente concentración de inhibidor. La K_i corresponde al valor absoluto de la intersección de la recta con el de la ordenada al origen (Segel, 1975).

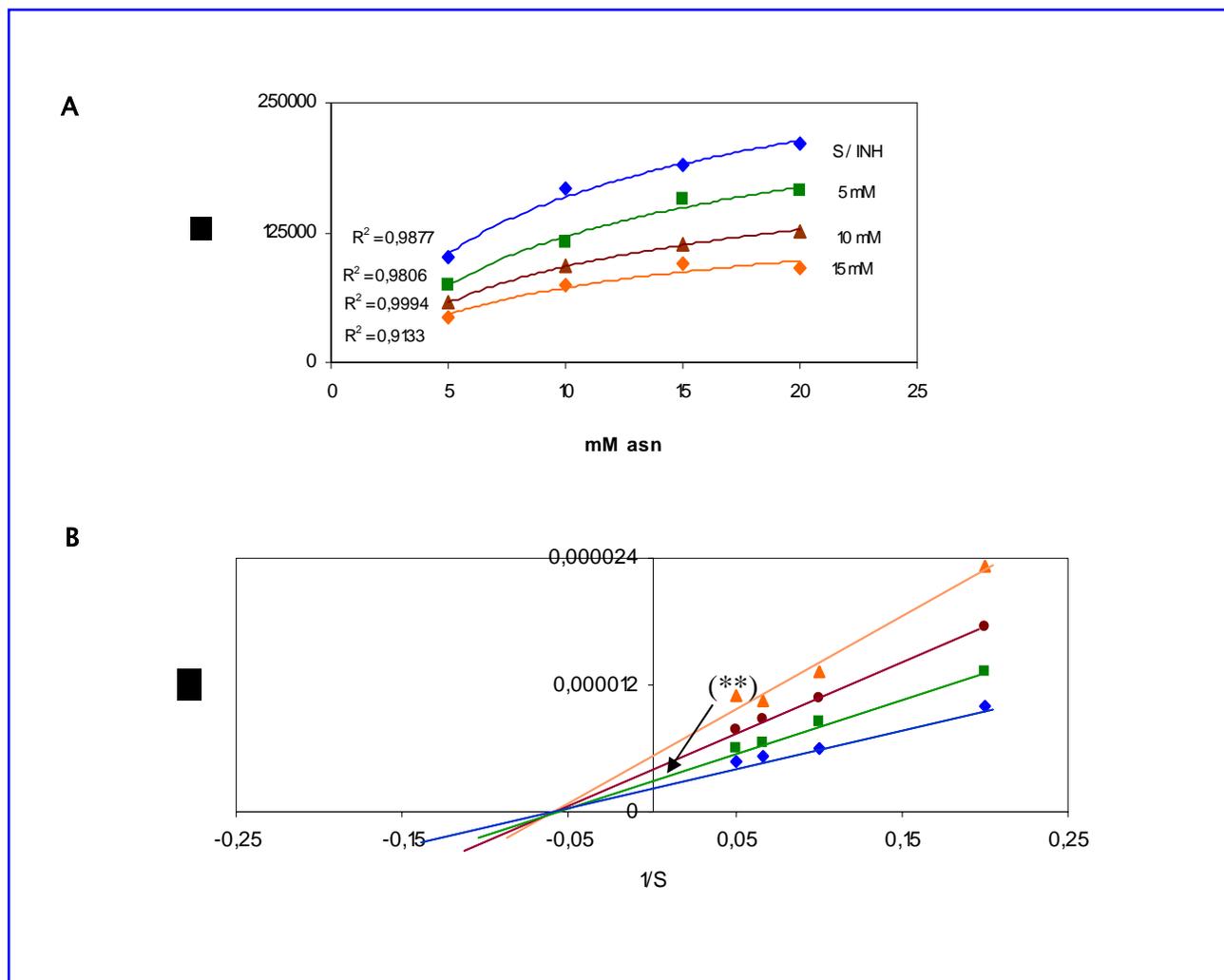


FIGURA 19. Inhibición de His₆-ansA II por amonio. A. Cinéticas de actividad donde se observa la reducción de la actividad específica en presencia del inhibidor. B. Gráfica del doble recíproco (Lineweaver – Burk) donde se observa la inhibición no competitiva ya que cambia la V_{max} aparente para cada concentración de inhibidor (**).

CUADRO 8. CONSTANTES DE INHIBICIÓN DE LOS PRODUCTOS.

Ki	
ASPARTATO	AMONIO
33.36 mM	10 mM

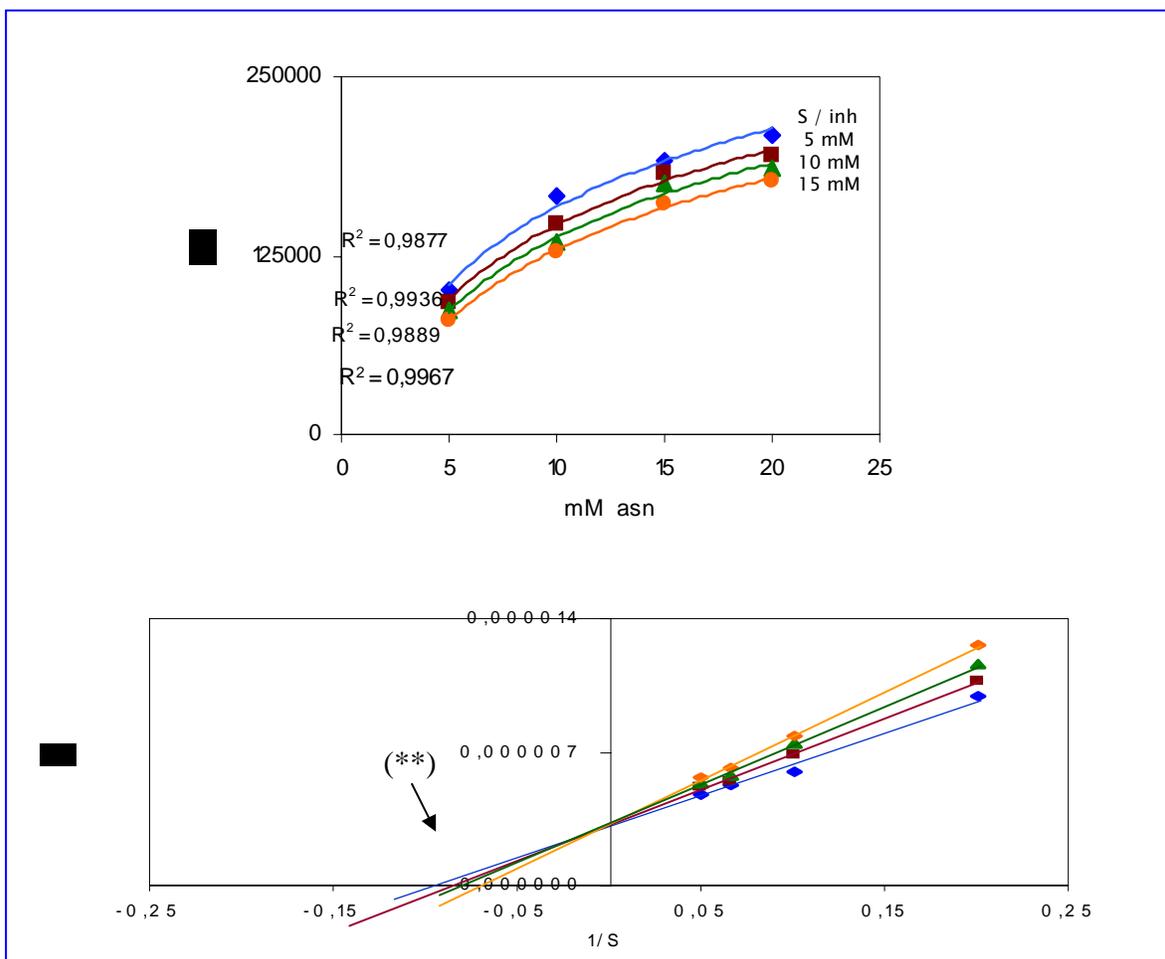


FIGURA 20. Inhibición de His₆ -ansA II por aspartato. A. Cinéticas de actividad donde se observa la reducción de la actividad específica en presencia del inhibidor. B. Gráfica del doble recíproco (Lineweaver – Burk) donde se observa la inhibición competitiva ya que cambia la K_m aparente para cada concentración de inhibidor (**).

A.5. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN PRESENCIA DE IONES DIVALENTES.

Se determinó la actividad enzimática de la proteína recombinante His₆ -ansa II con soluciones 1, 2 y 4 mM de cada uno de los cationes (Mg²⁺, Mn²⁺, NH₄²⁺ y Zn²⁺) en buffer de fosfatos y asparagina 10 mM a pH 9.

Las soluciones se dejaron reposar durante 12 horas para observar si presentaban precipitación. La solución de Ca²⁺ no precipitó, el resto de las soluciones en la concentración de 2 y 4 mM presentaron precipitación.

El hecho de que las soluciones se precipitaron nos llevó a probar el buffer de carbonatos a pH 9. Se observó precipitación sólo en las soluciones 4 mM de Zn²⁺, Mg²⁺ y Mn²⁺. Por lo que decidimos utilizar sólo las concentraciones de 1 y 2 mM de cada ión divalente para determinar actividad específica de His₆ -ansa II.

Los resultados indican que todos los iones probados inhibieron la actividad enzimática (fig. 21) El Mn²⁺ presentó mayor inhibición, mientras que el Ca²⁺ mostró inhibición independientemente de su concentración.

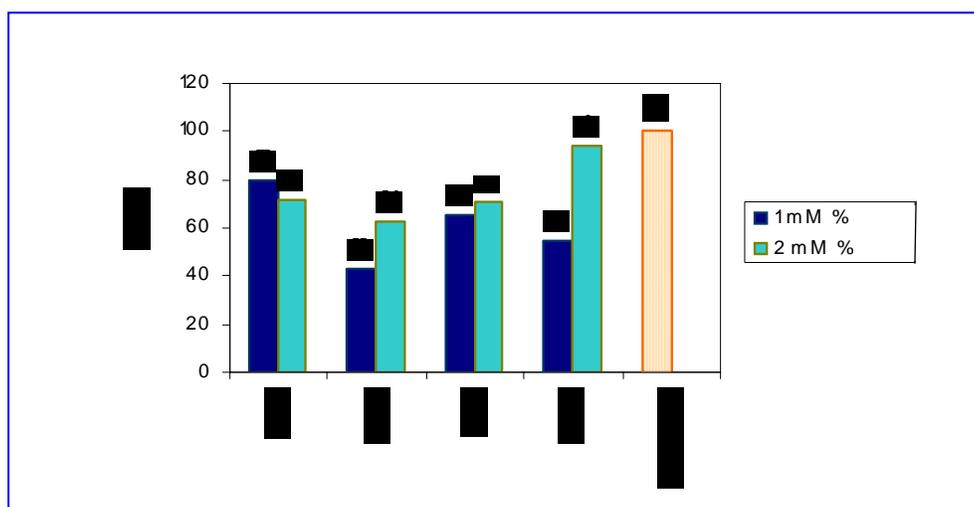


FIGURA 21. Actividad de His₆ -ansa II en porcentaje en presencia de iones divalentes.

Con respecto a los iones Mg^{2+} , Mn^{2+} y Zn^{2+} , se observa que aparentemente hay mayor inhibición en la solución 1 mM con respecto a la solución 2 mM. Estas soluciones precipitaron a 4 mM y probablemente presenten precipitación en la concentración 2 mM, fenómeno que es difícil observar. Por lo que la disponibilidad del catión soluble durante el ensayo a 2 mM, podría ser similar que en la solución 1 mM. Debido a lo anterior, tomaremos como la inhibición representativa la determinada por la solución 1 mM.

Se puede observar también que los iones Mn^{2+} , Mg^{2+} y Zn^{2+} , reducen significativamente la actividad enzimática en un 57, 55 y 65 %, respectivamente.

B. PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS.

B.1. PUNTO ISOELÉCTRICO (pI).

Se determinó el pI mediante un gel de Isoelectroenfoco (IEF). Se corrió 1 μ g de muestra en el carril en un gel IEF en las condiciones que indica el cuadro 9. En una cámara de electroforésis PhastSystem (Amersham Biosciences).

CUADRO 9. CONDICIONES DE CORRIDA PARA PhastGel System. IEF.

PASO	CONDICIONES				
	V	mA	W	°C	Vh
1	2 000	2.5	3.5	15	75
2	200	2.5	3.5	15	15
3	2 000	2.5	3.5	15	410

Este práctico sistema permite generar un gradiente de pH durante la corrida, las proteínas migran bajo su campo eléctrico por los poros del gel sin obstrucción a un punto del gradiente de pH que corresponde a su pI (Pharmacia). Se realiza en tiempos cortos de corrida (30 min), de tinción (1hr) y de desteñimiento (2 hr) y con las soluciones utilizadas para los geles de acrilamida tradicionales.

El análisis de la migración de His6 - ansa II mostró que el pI se encuentra alrededor de 8 (Fig. 22). Sin embargo, se observan cuatro bandas que migran juntas y con la misma densidad. Con ese patrón de bandas se obtuvo el valor de 8.9 de pI por migración relativa en comparación con los marcadores de pI (Fig. 23).

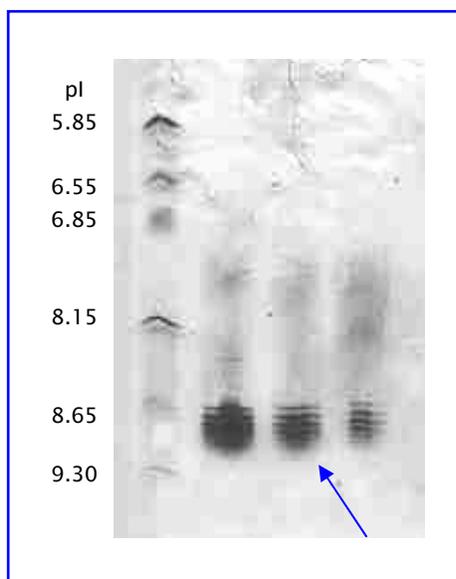


FIGURA 22. Gel SDS-IEF de acrilamida homogénea al 5%. Carril 2, 3 y 4. Se observan 4 bandas que migran entre 8 – 9 de pI.

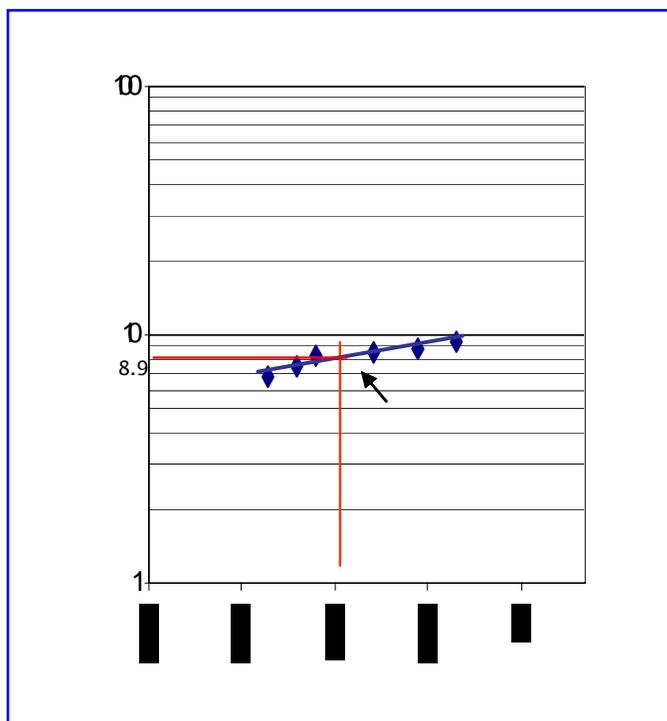


FIGURA 23. . Movilidad electroforética relativa de His₆ – ansa II en gel SDS-IEF mostrada por la línea de intersección. Se extrapoló la distancia de migración recorrida por la proteína.

Tomando en cuenta que podría interferir otra proteína en la determinación del pI, buscamos obtener una sola banda y purificar aún más la proteína mediante técnicas de electroelución. Se probaron 4 protocolos de elusión del gel nativo en cámara de electroelución Whole Gel Eluter (Bio – Rad) así como la elusión en bolsas de diálisis inmersas el tanque de cámara de electroforésis vertical Horizon 58 (Life Technologies) (Harris y Angal, 1990). Desgraciadamente, no obtuvimos resultados positivos que permitieran determinar los valores de pI de His₆- ansa II experimentalmente.

DISCUSION

En este trabajo se caracterizó bioquímicamente a la proteína asparaginasa II de *Rhizobium etli* bajo el esquema de la proteína recombinante His₆-ansa II.

La enzima fue purificada por cromatografía de afinidad. La actividad específica de la enzima fue de 160 000 UI. El hecho de generar una proteína recombinante nos permitió obtener un factor de purificación de 28 veces en tan sólo 3 pasos (clonación, inducción y purificación), además de obtener asparaginasa con un alto grado de pureza (Cuadro 5). La proteína recombinante incluye 26 residuos extras en su amino terminal donde se incluye el dominio de 6 histidinas en tándem. Esta región puede ser separada de la proteína por hidrólisis con la enzima enterocinasa en caso de ser necesario. Se ha observado por Huerta-Saquero y colaboradores (2001), que la actividad enzimática de las proteínas recombinantes no se ve afectada por la presencia de este péptido.

Se encontró que la adición de glicerol al 20% mantiene la estabilidad de la actividad enzimática cuando se conserva a - 70 °C. A diferencia de cuando se conserva la proteína sin glicerol, que disminuye hasta en un 50 % la actividad (datos no mostrados). El glicerol mantiene la actividad de la enzima arriba del 95% durante al menos 5 meses. La necesidad de la adición de un estabilizador ya ha sido observada para la conservación de otras proteínas recombinantes, esto es debido a que con el glicerol se forman cristales de agua más pequeños que al descongelarse dañan menos a la proteína (Tiwari, 1996).

Una muestra de la proteína recombinante His₆ -ansa II dializada presentó movilidad electroforética en un gel PAGE-NATIVO al 10 % (Fig. 11 A) que corresponde a 10.1.9 KDa. Mientras que la desnaturalización de dicha muestra en un gel PAGE - SDS al 10 % (Fig. 11 B), presenta una sola banda que migra a la distancia correspondiente de 46.5 Kda. Lo anterior nos sugiere que la asparaginasa II de *R. etli* es un homodímero en su estado nativo.

La conformación multimérica característica de las asparaginases de tipo II es homotetrámera, donde el sitio activo es conformado por la unión de dos monómeros que dimerizan formando un dímero de dímeros (Ortuño y Durán, 2003). Por lo que la asparaginasa de *R. etli* no posee la conformación multimérica del grupo de asparaginases II (Borek, D. and Jaskólski, M.).

R. etli no es el único microorganismo cuya asparaginasa II no comparte la configuración multimérica característica de las asparaginases de tipo II, ya que se han observado configuraciones de hexámeros en *Thermus thermophilus* de 200 Kda con subunidades de 33 kDa (Pritsa *et. al.*, 2001), así como en *Tetrahymena pyriformis* de 230 kDa con subunidades de 39 kDa (Triantafyllou *et. al.*, 1988). Mientras, en *Pseudomonas stutzeri* se ha comprobado que la asparaginasa actúa como monómero, con una migración relativa de 33 - 34 kDa (Manna *et. al.*, 1995). Esto indica que las características determinadas para clasificación de asparaginases tipo I y II, no se comparten por otros microorganismos.

Los parámetros físicos determinados fueron estabilidad en pH, temperatura, especificidad por su sustrato, actividad en presencia de cationes divalentes, así como su punto isoeléctrico.

De los resultados presentados en la fig. 14, se observa que la proteína His₆ - ansa II purificada presenta estabilidad a pH 9, la actividad específica más alta se presentó a 50 °C y sólo es específica a L-asparagina ya que no degrada sustratos análogos a asparagina como son: β-aspartil hidroxamato, D-asparagina, L- glutamina, D-glutamina y ácido aspártico.

Los valores de pH reportados para asparaginases de otros microorganismos se encuentran en el rango de 7.3 - 10 (Manna *et. al.*, 1995; Tiwari y Dua, 1996; Sobis y Mikucki, 1991), la asparaginasa II de *E. chrysantemii* presenta pH 8.6, mientras que la de *E. coli* pH10. Si bien el valor de pH obtenido para la asparaginasa II de *R. etli* no se encuentra en el rango de pH fisiológico (6.8 - 7.2), no es indicativo de que no pueda utilizarse como un probable agente terapéutico, puesto que las asparaginases empleadas en la clínica comparten esta característica.

La temperatura óptima de actividad de la asparaginasa II fue de 50 °C, esperando encontrar en vez de ello una mayor estabilidad en las condiciones óptimas a las que crece *R. etli* (25 - 30 °C) . Sin embargo, a dichas condiciones la actividad específica se ve disminuida en un 50 %. De la temperatura reportada para las asparaginastas de otros microorganismos, encontramos que son pocas las que se encuentran en rango fisiológico (36 - 37.5 °C) o cerca de él, como *Pseudomonas stutzeri* que presenta la mayor actividad específica a 37 °C (Manna *et. al.*, 1995) y *Staphylococcal sp.* a 30 -32 °C (Sobis y Mikucki, 1991). La asparaginasa de *Erwinia aroidea* presenta la mayor actividad específica a 45 °C (Tiwari y Dua, 1996), mientras que la mayor temperatura reportada es para la asparaginasa de *Thermus thermophilus* con 80 °C (Pritsa *et al.*, 2001).

El hecho de que la asparaginasa II de *R. etli* no presente estabilidad en pH y temperatura fisiológicos, no es indicativo que no degrade asparagina, sino de que la degradación se presentará con menor velocidad que la encontrada a sus valores óptimos. Esto también ocurre con las asparaginastas de *E. coli* y *E. chrysantemii*, ya que su estabilidad en pH se encuentra por arriba de las condiciones fisiológicas. Sin embargo, las asparaginastas con valores de pH y temperatura diferentes al rango fisiológico, han mostrado poseer actividad antitumoral, además de presentar actividad antitumoral en otros linajes cancerosos (Pritsa *et al.*, 2001).

Con respecto a la especificidad de la asparaginasa II de *R. etli*, esta presenta una ventaja sobre las asparaginastas de *E. coli* y *E. chrysantemii* puesto que no degrada gln. Se ha observado que las enzimas que degradan asn y gln provocan efectos secundarios más severos por la eliminación de gln del torrente sanguíneo, disminuyendo la respuesta del sistema inmunológico debido a la degradación de éste aminoácido (Kafkewitz y Bendich, 1983). Kelo y colaboradores (2002) proponen que los efectos secundarios causados por el tratamiento con L-asparaginasa se deben a la degradación de un grupo de compuestos llamados β - aspartil péptidos, relacionados con la degradación de proteínas glicosiladas cuyo metabolismo aún no se ha estudiado ampliamente.

Se ha comprobado que las asparaginastas de *E. coli* y *E. chrysantemii* pueden catalizar la hidrólisis de 4 pequeños β - aspartil péptidos, como son: β - aspartil alaninamida, β - aspartil glicinamida, β - aspartil serinamida y β - aspartil glicina (Kelo et. al., 2002). Por otra parte, se considera que la mayor contribución para generar los efectos secundarios al tratamiento, se debe al origen bacteriano de las asparaginastas (Ortuño y Durán, 2000).

Si bien la asparaginasa II de *R. etli* es altamente específica para degradar asparagina, la presencia de los análogos (β -aspartil hidroxamato, D-asparagina, L- glutamina, D-glutamina) en combinación con asn reduce la actividad específica (Fig. 18). Este resultado indica que dichos compuestos probablemente se unan al sitio activo ya que comparten cierta homología en su estructura. La unión se presenta inicialmente por los grupos α - amino y α - carboxilo de los análogos, los cuales impiden la unión de la asparagina al sitio activo de la enzima (Noronkosky et. el, 1998). Esa inhibición fue observada a concentraciones muy altas de análogos por lo que probablemente haya competitividad por el sitio activo. Seguramente, estos análogos no son hidrolizados ya su grupo amido queda lejos del sitio activo, como es el caso de la D y L- glutamina. Por otra parte, el grupo hidroxilo del análogo β -aspartil hidroxamato puede interferir en la unión de la asn al sitio activo por impedimento estérico (Lenhinger, 1993). En el caso de la D- asparagina, el impedimento para la unión al sitio activo se presenta por la diferente conformación quiral del carbono α del sustrato (Lenhinger, 1993).

Se pudo observar que la asparaginasa II de *R. etli* se inhibe por la presencia de cationes divalentes (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+}) (Fig. 21). Este resultado no es sorprendente, ya que muchas enzimas son inhibidas por dichos cationes. Así mismo, se ha observado que la asparaginasa de otros organismos son inhibidas por otros cationes como: Hg^{2+} , Cd^{2+} , Fe^{3+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} (Sobis y Mikucki, 1991; Manna et. al., 1995; Kiriakidis et. al., 2001).

Por otro lado, se ha observado que algunas asparaginastas pueden ser estimuladas por Na^{2+} , K^{2+} y Ca^{2+} (Tsavdaridis *et. al.*, 1994), y se ha reportado que la actividad de la asparaginasa de *T. thermophilus* no es modificada en presencia de iones como Mn^{2+} , Mg^{2+} y Ca^{2+} (Kiriakidis *et. al.*, 2001).

El punto Isoeléctrico obtenido a partir de la movilidad electroforética en gel IEF con gradiente de anfolinas 3 - 9, fue de 8.9 (Fig. 12). El punto Isoeléctrico reportado para otras asparaginastas se encuentra en el intervalo de 6.0 a 8.7 (Distasio y Niederman, 1976; Kitto *et. el.*, 1979; Triantafillou *et. al.*, 1988; Kiriakidis *et. al.*, 2001; Pritsa *et al.*, 2001).

Con respecto a los parámetros cinéticos, se encontró una K_m de 10 mM y una V_{max} de 250 000 nmoles $\text{NH}_4/\text{min}/\text{mg}$ de proteína. Estos datos nos indican una afinidad baja en comparación con la asparaginasa II de *E. coli* (11.5 μM) (Jennings y Beachman, 1993) y con la de *E. chrysantemii* (1.1 mM) (Callow *et. al.*, 1971). Las asparaginastas reportadas de otros microorganismos presentan una afinidad en el orden de magnitud mM (cuadro 18).

Como se había mencionado anteriormente, la asparaginasa II de *R. etli* se inhibe por sus productos (aspartato y amonio). Para determinar el tipo de inhibición probamos diferentes concentraciones de los anteriores inhibidores. Observando que el aspartato inhibe competitivamente (Fig. 20) mientras que el amonio lo hace acompetitivamente (Fig. 19), con una K_i de 33.36 mM y de 10 mM, respectivamente.

Es de suponerse que los productos de la hidrólisis de la asparaginasa inhiban la actividad enzimática puesto que en *R. etli*, el gen que codifica para la asparaginasa conforma un operón con un gen adyacente que codifica para la asparatasa (Fig. 4) (Ortuño-Olea y Durán-Vargas. 2000).

En el catabolismo de ans participan L-asparaginasa y L-aspartasa para utilizar asn como fuente de carbono, por lo que al trabajar coordinadamente, el aspartato (producto de la hidrólisis de la ans por la asparaginasa), es utilizado inmediatamente por la L-aspartasa para producir fumarato y amonio. Ambas enzimas producen amonio el cual es asimilado para la síntesis de proteínas (Bravo y Mora, 1988).

Con respecto a la secuencia de la proteína, se determinó por Borek y Jaskólski en 2001 que la asparaginasa se encuentran agrupadas en 3 grandes familias: la asparaginasa tipo bacteriano (de los tipos I y II), la asparaginasa de plantas y finalmente la asparaginasa II de *R. etli* que es única en su grupo. Debido a la secuencia tan diferente que presenta. Por lo que la asparaginasa II de *R. etli* se ha agrupado dentro de una familia nueva de proteínas.

Las asparaginasas empleadas contra el tratamiento de la LLA (de *E. coli* y *E. crhysantemii*) comparten alta homología entre ellas (43%), pero el hecho de degradar glutamina les confiere cierta desventaja al ser administrada a los pacientes con LLA. Comparando las secuencias de los probables residuos de aminoácidos involucrados en la actividad catalítica de ambas proteínas y de otros microorganismos contra la asparaginasa II de *R. etli*, se observa que comparten un sitio activo altamente conservado (en el cual se encuentra la Treonina 89) que no esta presente en *R. etli* (Fig. 24 B). Con respecto a la homología de las secuencias, *R. etli* forma un grupo completamente divergente a todos ellos, como lo muestra la figura 24 A.

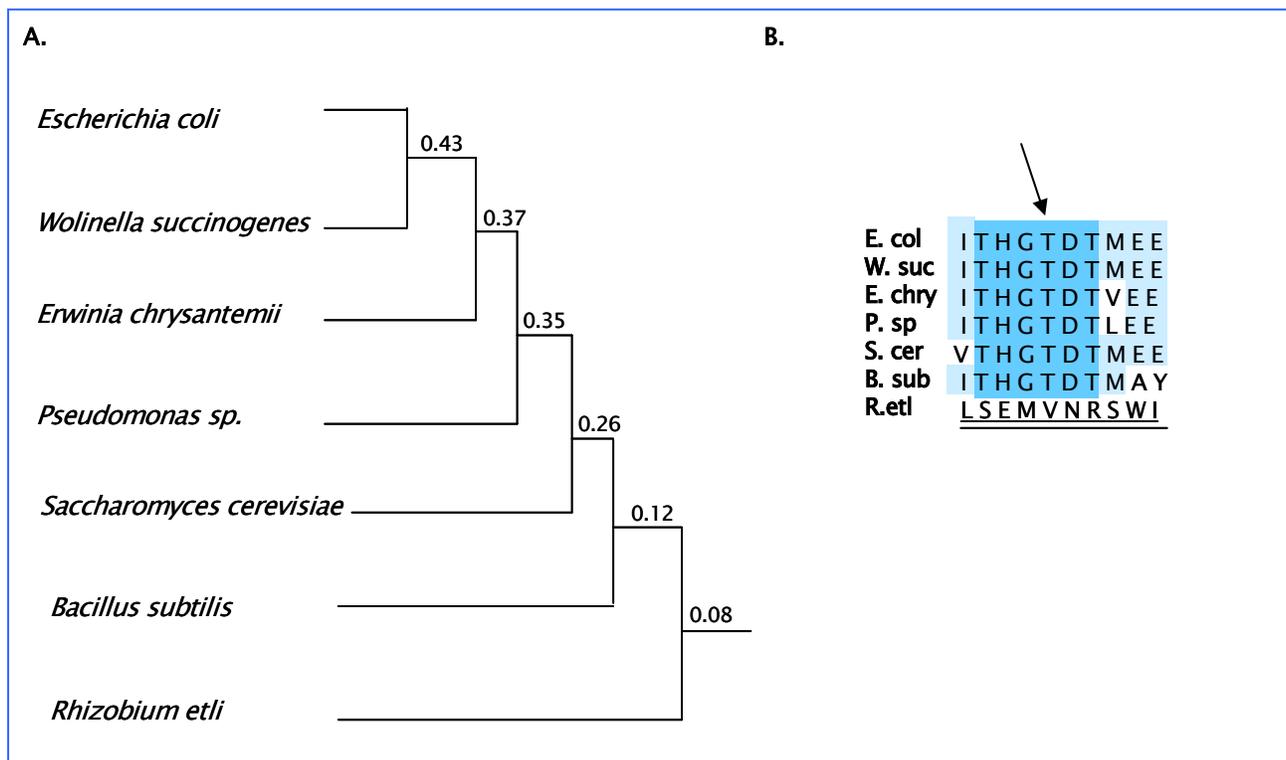


Fig 24. Dendrograma y alineamiento de secuencia de residuos de aminoácidos cercanos al probable sitio activo en asparaginases de microorganismos. A. Dendrograma realizado con el programa DNAMAN a partir de las secuencia de aminoácidos obtenidas del sitio del Nacional Center for Biotechnology Information (<http://NCBI.nlm.nih.gov/>). B. Alineamiento del probable sitio activo de las asparaginases bacterianas: E.col, *E. coli*; W.suc, *W. succinogenes*; E. chry, *E. chrysantemii*; P.sp, *Pseudomonas sp*; S. cer, *S. cerevisiae*; B. sub, *B. subtilis*; R.etl, *R. etli*.

El alineamiento de la secuencia de *R. etli* con otras asparaginases del grupo de las Rhizobiaceas muestra que sólo 4 de ellas comparten una secuencia altamente conservada reportada como el probable sitio activo (Borek y Jaskólski, 2001). Esta secuencia se encuentra hacia el extremo carboxilo terminal alejada por 71 residuos de aminoácidos. Notable es que, al alinear la secuencia de *E. coli* con el mismo grupo de las rhizobiaceas (Fig. 25 B) sólo 4 de ellas comparten homología con el sitio activo de la asparaginasa II de *E. coli*. Por lo que, al realizar el dendrograma es evidente que las asparaginases del grupo de las rhizobiaceas se encuentran divididas en dos grandes grupos, el primero (Fig. 25 A.1) donde se encuentra la asparaginasa

II de *R. etli*, formando un grupo divergente al resto de las asparagininasas del grupo de las rhizobiaceas, sin embargo comparten el probable sitio activo. Y por otro lado, se agrupan las asparagininasas del grupo de las rhizobiaceas que comparten el sitio activo de *E. coli* (Fig. 25 A.2). Ambos grupos se encuentran altamente divergentes uno de otro (Fig. 25 A).

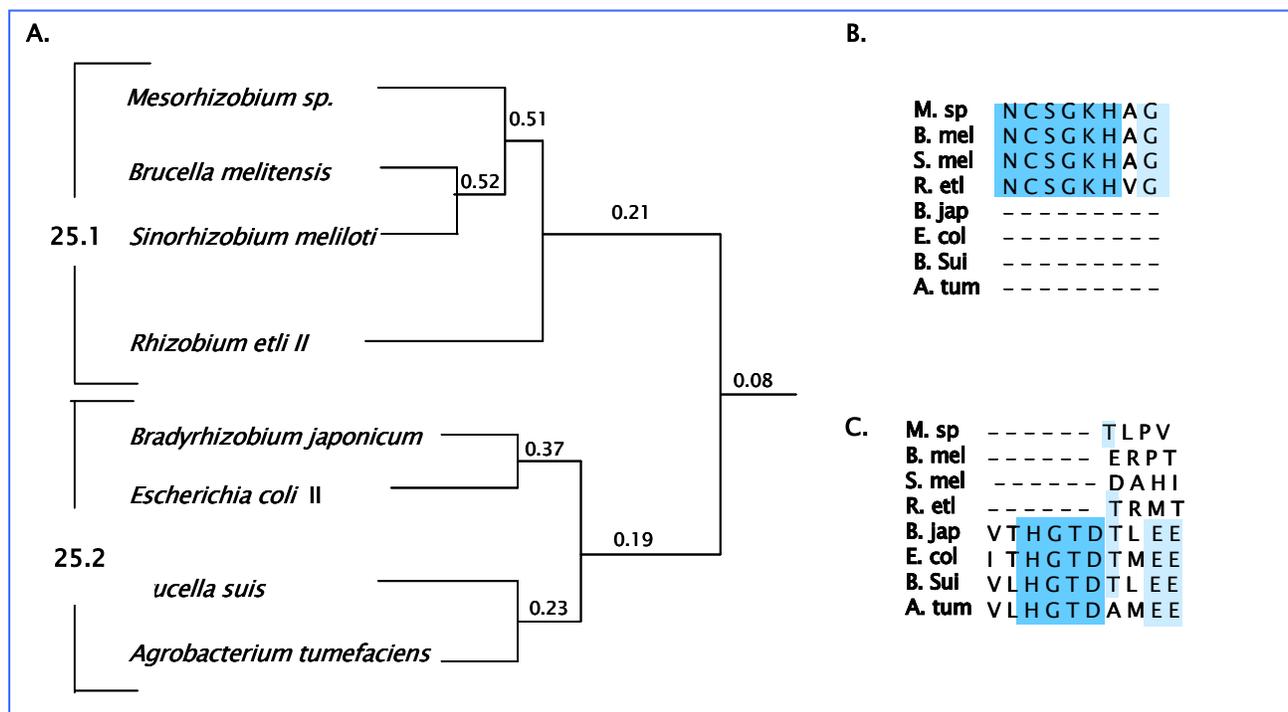


Fig 25. Dendrograma y alineamiento de secuencia de residuos de aminoácidos cercanos al probable sitio activo en asparagininasas de rhizobiaceas. A. Dendrograma realizado con el programa DNAMAN a partir de las secuencia de aminoácidos obtenidas del sitio del Nacional Center for Biotechnology Information (<http://NCBI.nlm.nih.gov/>). B. Alineamiento alrededor del probable sitio activo y C. Región conservada de asparagininasas de algunas rhizobiaceas: M.sp, *Mesorhizobium sp*; B. mel, *B. melitensis*; S. mel, *S. meliloti*; R. etl, *R. etli*; B. jap, *B. japonicum*; E.col, *E. coli*; B. sui, *B. suis*; A. tum, *A. tumefaciens*.

Esto sugiere que el gen *ansA* posee una historia evolutiva diferente a la de otras asparagininasas reportadas de otros organismos. La ausencia de similitud entre la asparaginasa II de *R. etli* y otros organismos sugiere también la existencia de mecanismos diferentes para la degradación de la asn. Esta ausencia de similitud también se puede observar al comparar las secuencias de residuos de aminoácidos con el grupo de las rhizobiaceas. En donde muy probablemente la asparaginasa II de *R. etli* ha sufrido evolución independiente a su grupo bacteriano.

La baja homología de asparaginasa II de *R. etli* con las secuencias de asparaginasa utilizadas como agente antineoplásico, así como con las asparaginasa de otros microorganismos, sugiere que la asparaginasa II de *R. etli* pertenece a una familia diferente de proteínas. Hecho que la identifica como una asparaginasa atípica, ya que también presenta características bioquímicas y fisicoquímicas diferentes.

Las diferentes características bioquímicas y fisicoquímicas de asparaginasa II de *R. etli* en comparación con otros grupos, presentadas en este trabajo, sugiere una diferente inmunogenicidad. La degradación de asparagina no es tan eficiente como en las asparaginasas reportadas, sin embargo presentó estabilidad durante el proceso de purificación, además de no degradar glutamina. La asparaginasa II de *R. etli* es altamente específica de asn.

Por todo lo anterior, nos permitimos proponer a la asparaginasa II de *R. etli* como una candidata para estudiar su efecto antilinfoma, así como para determinar su actividad inmunosupresiva. Esos datos permitirán en un futuro, considerar el uso de la asparaginasa II de *R. etli* como alternativa en el tratamiento de la LLA.

CONCLUSIONES

- La asparaginasa II de *R. etli* fue purificada por cromatografía de afinidad con un rendimiento del 97 % y factor de purificación de 28.
- La enzima activa se comporta como un homodímero con masa molecular de 101.9 kDa en su estado nativo y 45.6 kDa por subunidad con punto Isoeléctrico de 8.9.
- La actividad específica de la proteína purificada fue de 160 000 UI.
- Su estabilidad en gradiente de temperatura fue a 50 °C mientras que la estabilidad en gradiente de pH fue a 9.
- Con respecto a los parámetros cinéticos, la asparaginasa II de *R. etli* presentó una Km de 10 mM y Vmax de 200 000 nmoles NH₄/min/mgP.
- La enzima fue inhibida por sus productos aspartato y amonio, presentando inhibición competitiva por aspartato y acompetitiva por NH₄. Con una Ki de 33.36 y de 10 mM, respectivamente.
- Es altamente específica por asparagina ya que no degrada glutamina ni otros compuestos análogos de la asparagina. Dichos compuestos en presencia de asparagina disminuyen la actividad enzimática.
- La enzima también fue inhibida por los cationes divalentes Na²⁺, Mn²⁺, Mg²⁺, y Ca²⁺.

- La secuencia de aminoácidos de la asparaginasa II de *R. etli* presenta baja homología con la asparaginasa del grupo de rhizobiaceas así como con la de otros microorganismos, por lo que forma parte de una familia diferente de proteínas.
- De las 8 secuencias de asparaginasa reportadas del grupo de las rhizobiaceas, sólo con 4 de ellas presentó la región conservada del probable sitio activo. Por lo que en el grupo de las rhizobiaceas probablemente el sitio activo divergió formando 2 grupos diferentes.

MATERIAL Y METODOS

I. CEPAS Y PLÁSMIDOS.

CUADRO 12. CEPAS UTILIZADAS.

CEPAS	CARACTERÍSTICAS	REFERENCIA
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	Cepa diseñada para sobreexpresión de proteínas. No expresa la proteasa de membrana ompT. Amp ^R .	Donahue y Bebee, 1991
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) pPRIL	Produce tRNA's para Isoleucina, Prolina, Leucina y Valina. Cm ^R .	Este trabajo
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) pPRIL pANSA	Clona que posee el plásmido pANSA para la sobreexpresión del gen que codifica para la asparaginasa II de <i>R. etli</i> . Cm ^R Amp ^R .	Este trabajo
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) pANSA	Clona que contiene la construcción pANSA que posee el gen <i>asnA</i> que codifica para la asparaginasa II de <i>R. etli</i> . Amp ^R .	Este trabajo
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) pTrcHis A	Clona que presenta el vector de sobreexpresión. Amp ^R .	Este trabajo
<i>E. coli</i> HB101 pAHZ12	Cepa del banco genómico de <i>R. etli</i> , que posee en operón de la asparaginasa clonado en el cósmico pLAFR1. Cm ^R .	Huerta-Zepeda, 1997.
<i>E. coli</i> JM109	Amp ^R .	Stratagene.
<i>E. coli</i> JM109 pTrcHis A	Clona que contiene el vector de sobreexpresión. Amp ^R .	Invitrogen.
<i>R. etli</i> CE3	Tipo silvestre Na ^R Sm ^R	

CUADRO 13. PLÁSMIDO UTILIZADOS.

PLÁSMIDOS	CARACTERÍSTICAS	REFERENCIA
pPRIL	Vector que produce tRNA's para isoleucina, Prolina, Valina y Leucina.	Kane, 1995
pTrcHis A	Vector de expresión con promotor híbrido (trc-lac) inducible por IPTG, seleccionable por α - complementación. Adiciona histidinas en tandem en el NH ₃ terminal de la proteína clonada en él. Amp ^R (ANEXO 1).	Invitrogen.
pANSA	Gen <i>ansA</i> clonado en pTrcHis A en los sitios <i>Bam</i> H1 y <i>Eco</i> R1. Codifica para la asparaginasa II de <i>R. etli</i> . Amp ^R .	Este trabajo
pAHZ12	Aislado del banco de <i>R. etli</i> clonado en pLAFR1, contiene al operón de la asparaginasa II. Tc ^R .	Huerta-Zepeda, 1997.

La letra "R" como superíndice significa resistencia.

II. MEDIOS DE CRECIMIENTO Y ANTIBIÓTICOS.

Los medios de crecimiento utilizados fueron Luria- Bertani (LB) para *E. coli* (Millar y Stadtman, 1972) y peptona y extracto de levadura (PY) para *R. etli* (Beringer *et. al.*, 1979), como se indica en los cuadros 15 y 16, respectivamente.

CUADRO 15. MEDIO DE CRECIMIENTO LB.

REACTIVO	CONCENTRACIÓN
Peptona de caseína	1.0 %
Extracto de levadura	0.5 %
CaCl ₂	1.0 %
Agar (sólo para medio sólido)	1.5 %

CUADRO 16. MEDIO DE CRECIMIENTO PY.

REACTIVO	CONCENTRACIÓN
Peptona de caseína	0.5 %
Extracto de levadura	0.3 %
CaCl ₂	7 mM
Agar (sólo para medio sólido)	1.5 %

CUADRO 17. ANTIBIÓTICOS.

ANTIBIÓTICO	ABREVIACIÓN	CONCENTRACIÓN (µg/ml)
Ácido nalidíxico	Nal	20
Cloramfenicol	Cm	50
Estreptomina	Sm	200
Ampicilina	Amp	200

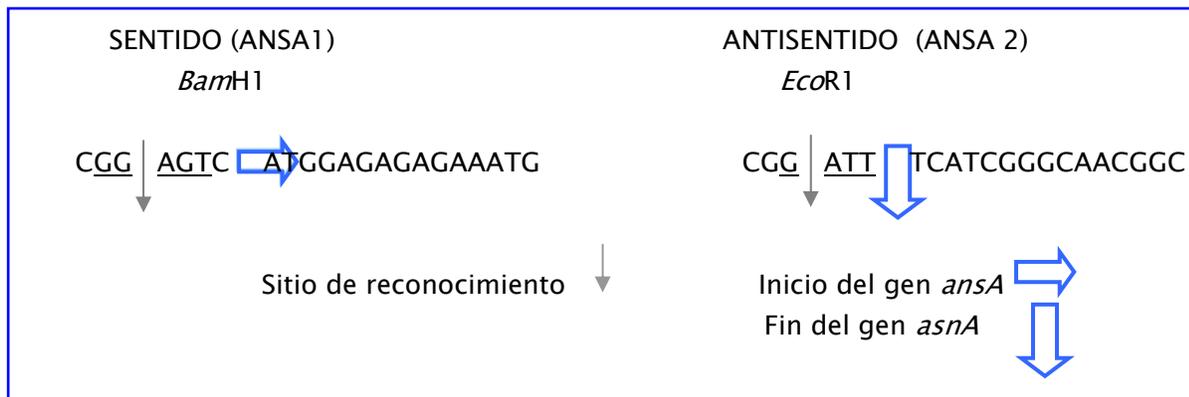
III. PRIMERA FASE: CLONACIÓN DEL GEN QUE CODIFICA PARA LA ASPARAGINASA II DE *R. etli* EN EL VECTOR pTrcHis A.

Para realizar la PCR se utilizaron las siguientes técnicas:

III A. AMPLIFICACIÓN DEL GEN *ansA* DE LA ASPARAGINASA II DE *R. etli*.

A partir de la secuencia de gen que codifica para la asparaginasa II de *R. etli* diseñamos oligonucleótidos para su amplificación mediante PCR. Dichos oligonucleótidos contienen secuencias de reconocimiento de las enzimas de restricción *Bam*H1 y *Eco*R1 como indica el cuadro 18.

CUADRO 18. DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS.



Se realizó la PCR tomando como templado el plásmido pAHZ12 que contiene el operón *ansA* de *R. etli*. Los volúmenes empleados así como las condiciones de reacción se indican en los cuadros 19 y 20, respectivamente.

CUADRO 19. PREPARACIÓN DE LA PCR.

MEZCLA	VOLÚMEN (μl)
Agua	33
DMSO	5
Amortiguador Taq Polimerasa (10X)	5
dNTP's (10 mM)	4
MgCl ₂ (50 mM)	1.5
TAQ Platinum Polimerasa(2.5 U)	0.12
oligonucleótido ANS1	1
oligonucleótido ANS2	1
Templado (pAHZ12) (ng/μl)	2
Reacción de 50 μl	

CUADRO 20. CONDICIONES DE CORRIDA DE LA PCR.

Desnaturalización inicial a 95 °C	2 min	
Alineamiento a 50 °C	30 seg	} 35 ciclos
Síntesis a 72 °C	45 seg	
Desnaturalización a 92 °C	45 seg	
Alineamiento final a 50 °C	2 min	

Finalmente se realizó la purificación del producto de PCR se realizó utilizando una columna de sílica según el protocolo Centrifugation Protocol Insert del kit Rapid PCR Purification Systems (Marligen Bioscience).

III B. LIGACIÓN DE ASPARAGINASA II Y pTrcHis A.

PROCEDIMIENTO:

1. En un tubo eppendorf se deposita el producto de PCR previamente purificado y el plásmido pTrcHis A previamente digeridos con *Bam*H1 y *Eco*R1 y purificado, cuidando que el inserto esté en mayor o igual proporción molar (se utiliza entre 1 y 100 ng de DNA), el volumen se lleva a 10 µl con agua estéril.
2. Se incuba a 65 °C durante 10 min, se enfría por inmersión en baño de hielo.
3. Se prepara una mezcla que contenga: 2.0 µl de amortiguador de ligación 5X, 0.3 U de T4 DNA ligasa y 1 µl de agua estéril.
4. A la mezcla anterior se adiciona el volumen total del tubo del paso 2, se mezcla suavemente con la pipeta.
5. Se incuba por 12 horas a 16 °C o al menos durante 4 hrs. Se puede conservar la ligación a -20 °C hasta utilizarla para transformar.

III C. TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES.**PROCEDIMIENTO:**

1. Descongelar las células a temperatura ambiente y alicuotear 200 μ l en tubos eppendorf.
2. Mantener los tubos en baño de hielo y agregar 1, 3 y 5 μ l de la solución del plásmido pTrcHis A ligado con el producto de PCR.
3. Resuspender con la pipeta despacio e incubar en el baño de hielo durante 30 min.
4. Introducir a un baño de 42 °C durante 30 seg sin agitar y regresar inmediatamente los tubos al baño de hielo.
5. Agregar a cada tubo 800 μ l del medio SOC y transferir el contenido de cada eppendorf a un tubo estéril de 13 X 100 mm.
6. Incubar durante 1 hora a 37 °C con agitación de 250 rpm.
7. Transferir nuevamente el cultivo a un tubo eppendorf para centrifugarlo durante 1 min a 10,000 rpm a temperatura ambiente.
8. Decantar totalmente el sobrenadante.
9. Resuspender con 50 μ l de medio SOC (cuadro 21) y plaquear en cajas de medio sólido LB + Amp.

CUADRO 21. MEDIO SOC PARA TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS.

REACTIVO	CONCENTRACIÓN
Peptona de caseína	2 %
Extracto de levadura	0.5 %
NaCl	10 mM
KCl	2.5 mM
MgCl ₂	10 mM
MgSO ₄	10 mM
Glucosa	0.036 g

III D. SELECCIÓN DE TRANSFORMANTES DE *E. coli* JM109 POR α - COMPLEMENTACIÓN Y RESISTENCIA A ANTIBIÓTICO.

PROCEDIMIENTO:

1. De las colonias obtenidas en la transformación se eligen 200 colonias para picar.
2. Se pica la colonia elegida primero en la caja LB + Amp + IPTG (1 mM)/ XGal (0.4 mM) y en la misma posición se pica en la caja LB + Amp.
3. Se inoculan las cajas durante 12 hrs a 37 °C.
4. Las colonias blancas (positivas) se eligen de la caja LB + Amp.
5. Se inocula cada colonia en 5 ml de medio líquido LB + Amp y se incuba durante 12 hrs a 37 °C.
6. En un tubo eppendorf se colecta 1 ml del medio y se adiciona 88 μ l de DMSO, se criopreserva a -70 °C.

III E. ANÁLISIS DE RESTRICCIÓN DEL PLÁSMIDO *pANSA* CON *Bam*H1 y *Eco*R1.

PROCEDIMIENTO:

1. Se adiciona el DNA del plásmido clonado en un tubo eppendorf (1 μ g).
2. Adicionar 1/10 del volumen total de amortiguador 10X de las enzimas de restricción.
3. Adicionar agua desionizada estéril al 80 % del volumen total.
4. Adicionar las enzimas de restricción (1 unidad/ μ g de DNA) y agitar suavemente con la pipeta.
5. Incubar a 37 °C durante 1 hr.
6. Preparar un gel de agarosa al 1 %, cargar las muestras del DNA digerido en los pozos del gel y correrlo a 80 V durante 1.5 hrs.

III F. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE ASPARAGINASA II DE *R. etli* DE EXTRACTOS CELULARES.

PROCEDIMIENTO:

a) Extracción de la enzima con y sin inducción.

1. Sembrar las cepas de *E. coli* en medio sólido LB con sus respectivos antibióticos.
2. Incubar 12 hrs a 37 °C.
3. Recolectar una asada e inocular medio líquido LB con antibiótico.
4. Incubar 12 hrs a 37 °C con agitación constante de 200 rpm.
5. Centrifugar a 10,000 rpm durante 10 min a 4 °C.
6. Resuspender la pastilla en 1 ml de amortiguador de lisis (*).
7. Sonicar con pulsos de 30 seg con intervalos de 30 seg o hasta que se encuentren lisadas las células a 15 micrones en ultra sonicador Soniprep 150.
8. Centrifugar en microcentrífuga durante 5 min a 14,000 rpm.
9. Separar el sobrenadante en un tubo eppendorf nuevo y estéril, y mantenerlo en hielo.

b) Cuantificación de actividad enzimática.

1. Adicionar a un tubo eppendorf 40 µl del amortiguador de reacción (**): amortiguador de fosfatos + asparagina 10 mM disuelta en el mismo amortiguador.
2. Adicionar 10 µl del extracto enzimático e incubar a 37 °C durante 0,1,2,4,8,15 y 30 min.
3. Detener la reacción con 50 µl de ácido tricloroacético (TCA) al 5 %. Para el tiempo 0 min, primero adicionar el TCA y después el extracto enzimático.
4. Centrifugar durante 3 min a 12,000 rpm.

c) Determinación de la producción de amonio.

1. Colocar en tubos de vidrio de 13 X 180 mm, 180 µl de agua desionizada estéril y posteriormente adicionar 20 µl del sobrenadante de la reacción anterior (paso 4 de b).
2. Adicionar 1 ml de la solución 1 y agitar en vortex.
3. Adicionar 1 ml de la solución 2 y agitar en vortex.

4. Incubar durante 1 hr a temperatura ambiente.
5. Cuantificar absorbancia en espectrofotómetro a A_{625} .
6. Preparar tubo estandar con 40 μ l del stock de amonio 2 mM y se continúa como indica el protocolo.

d) **Determinación de la actividad específica.**

1. Restarle el valor del tiempo 0 a cada lectura de absorbancia.
2. Con los datos del tubo estándar calcular la concentración de nmoles de NH_4 producidos en cada tiempo.
3. Cada valor obtenido se divide entre el tiempo de reacción para calcular nmoles NH_4/min .
4. Finalmente dividir el dato anterior entre la concentración de proteína total. La actividad se expresa en UI (nmoles $\text{NH}_4/\text{min}/\text{mgP}$).

AMORTIGUADOR DE LÍISIS (*).	
REACTIVO	CONCENTRACIÓN
NaH_2PO_4	20 mM
NaCl	400 mM
pH 8 (ajustado con NaOH)	

AMORTIGUADOR DE REACCIÓN (**).	
REACTIVO	CONCENTRACIÓN
KH_2PO_4	100 mM
pH 7.6 (ajustado con KOH)	

SOLUCIÓN 1.	
REACTIVO	CONCENTRACIÓN
Fenol	100 mM
Nitroprusiato de sodio	0.2 mM

SOLUCIÓN 2.	
REACTIVO	CONCENTRACIÓN
NaOH	125 mM
Hipoclorito de sodio al 10 %.	6 mM

* Se almacenan en frasco ambar a 4 °C.

IV. SEGUNDA FASE: PURIFICACIÓN DE His₆ – ansa II.

Se realizó un ensayo control de sobreexpresión de la proteína recombinante His₆ – ansa II con las cepas que indica el cuadro 22.

CUADRO 22. CEPAS PROBADAS PARA ENSAYO CONTROL DE SOBREPRESIÓN.

CEPAS.
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) pPRIL
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) pTrcHis A
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) pANSA
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) pPRIL pANSA

IV A. PROTOCOLO DE ENSAYO CONTROL DE LA SOBREPRESIÓN.

PROCEDIMIENTO:

1. Inocular 10 µl del cultivo criopreservado en 5 ml de medio LB con sus respectivos antibióticos.
2. Incubar 12 hrs a 37 °C.
3. Se inocula con 2 ml del crecimiento de cada una de las cepas en 50 ml de medio líquido LB con sus respectivos antibióticos a una D. O. de 0.05 A₅₉₅.
4. Incubar a 37 °C con agitación constante de 200 rpm hasta alcanzar una densidad óptica de 0.4 a A₅₉₅.
5. Cada uno de los cultivos se divide en partes iguales y sólo a una de ellas adicionar 125 µl de IPTG (0.5 mM concentración final) e incubar los matraces por 12 hrs a 30 °C con agitación constante de 200 rpm hasta alcanzar una densidad óptica de 1.4 a A₅₉₅.
6. Recolectar el cultivo y centrifugar durante 10 min a 10,000 rpm a 4 °C.

7. La pastilla se resuspende con 2 ml de amortiguador de lisis (*) y se adiciona Lisosima (1 mg/ml) y fluoruro de fenil-metanesulfonil (PMSF 1 mM), se incuba durante 20 min en hielo.
8. Sonicar a 15 micrones 6 veces dando pulsos de 30 seg con intervalos de 1 min y al final dar 3 pulsos de 1 min con intervalos de 1 min, en ultra sonicador Soniprep 150.
9. Centrifugar durante 10 min a 10,000 rpm a 4 °C.
10. Cuantificar proteína total al sobrenadante. Correr un gel desnaturizante de poliacrilamida al 10 %.
11. Cuantificar actividad enzimática.

IV B. SOBREENPRESIÓN DE LA ASPARAGINASA II Y EXTRACCIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE His₆ - ansa II.

PROCEDIMIENTO:

1. Sembrar en medio sólido LB Cm Amp 20 µl del cultivo criopreservado de la cepa *E. coli* BL21 (DE3) pPRIL pANSA.
2. Incubar por 12 hrs a 37 °C.
3. Se inoculan 25 ml de medio líquido LB Cm Amp con una asada del crecimiento.
4. Incubar por 12 hrs a 37 °C con agitación constante de 200 rpm.
5. Se inocula en matraces Fermbatch con 1 lt de medio LB Cm Amp a una D. O. de 0.05 A₅₉₅*.
6. Incubar a 37 °C con agitación constante de 200 rpm hasta alcanzar una lectura de 0.4 a A₅₉₅.
7. Adicionar IPTG (0.5 mM) e incubar por 12 hrs a 30 °C con agitación constante de 200 rpm.
8. Recolectar el cultivo y centrifugar durante 10 min a 10,000 rpm a 4 °C.
9. El pastilla se resuspende con 50 ml de amortiguador de lisis (*) y se adiciona Lisosima (1 mg/ml) y PMSF (1 mM), se incuba durante 20 min en hielo.

10. Sonicar a 15 micrones 6 veces dando pulsos de 30 seg con intervalos de 1 min y al final dar 3 pulsos de 1 min con intervalos de 1 min, en ultra sonicador Soniprep 150.
11. Centrifugar durante 10 min a 10,000 rpm a 4 °C. El sobrenadante se guarda en tubos nuevos y estériles. Para criopreservarlo a -70 °C es necesario congelación rápida en una cama de hielo seco y acetona.

IV C. PURIFICACIÓN POR CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE His₆ - ansa II.

PROCEDIMIENTO:

1. La proteína extraída del paso 11 del protocolo anterior (que se encuentra en el sobrenadante) se filtra a través de membranas de 0.22 µm y se recolecta en tubo nuevo y estéril (aprox. 85 ml).
2. La columna de 5 ml Hi-Trap Chelating HP (Amersham Biosciences) se lava con 4 volúmenes de agua desionizada.
3. Cargar con 2 volúmenes de una solución NiSO₄ 100 mM y lavar con 2 volúmenes de agua desionizada.
4. Equilibrar con 3 volúmenes de amortiguador de lisis (*).
5. Pasar todo el extracto por la columna suavemente y recolectar.
6. Dar lavados a la columna con 5 volúmenes de amortiguador de lisis (*) con 10, 40 60 y 100 mM de Imidazol.
7. Eluir la proteína con 10 ml de amortiguador de lisis (*) con 500 mM de Imidazol, descartar los 3 primeros ml y recolectar por separado cada ml restante.
8. Adicionar 200 µl de glicerol a cada tubo y colocar en hielo.
9. Lavar la columna con 5 ml de agua desionizada y colectar.
10. Finalmente, lavar la columna con 2 volúmenes de EDTA 0.2 M. Adicionar 5 volúmenes de agua desionizada.
11. Con 20 µl de cada lavado, elusión y agua colectada, se cuantifica proteína por la técnica de Bradford.

12. Para conocer el grado de pureza de las eluciones correr un gel SDS-PAGE al 10 % y NATIVO-PAG al 10 %. Correrlo a 30 y 70 mA en la fase concentradora y separadora respectivamente.
13. Hacer un stock de proteína con las muestras puras.

IV D. DIÁLISIS DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE His₆- ansa II.

PROCEDIMIENTO:

1. Se introducen dentro de las bolsas de diálisis la muestra de proteína.
2. Dializar la proteína contra imidazol a 4°C con agitación suave durante 3 hrs en 4 litros de amortiguador de lisis (*) con glicerol al 15% .
3. Se cambia por solución nueva a 4 °C y se introducen las bolsas de diálisis, se mantiene por 12 hrs con agitación suave.
4. Se realiza nuevamente otro cambio con la misma solución a 4 °C y se mantiene durante 4 hrs.
5. Finalmente se recolecta la muestra y se coloca en tubos eppendorf nuevos y estériles. Se congela rápidamente en hielo seco. Se criopreserva a -70 °C.

IV E. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE His₆- ansa II.

Para cuantificar la actividad enzimática de la asparaginasa se sigue el mismo protocolo descrito para la determinación de actividad enzimática de extractos celulares, excepto que no aplica el inciso a. En el inciso b la concentración de proteína purificada es de 0.012 µg/ml (del stock) y los tiempos de reacción son de 0, 0.5, 1, 2, 4, 6 y 8 min. Los incisos c y d no son modificados.

V. TERCERA FASE: CARACTERIZACIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE His₆ - ansa II.

Para caracterizar los parámetros bioquímicos de la proteína recombinante se siguió el mismo protocolo para determinar actividad específica de His₆ - ansa II, sólo se muestran las modificaciones que se aplicaron en cada protocolo. La concentración de proteína pura en todos los ensayos fue de 0.12 µg/ml, la concentración de asn fue de 10 mM en solución con el amortiguador de reacción (**), el valor de pH fue de 9 excepto en el ensayo de estabilidad en gradiente de pH y la temperatura utilizada fue de 37 °C, excepto para el ensayo de estabilidad en gradiente de temperatura. Los parámetros determinados se resumen en el cuadro 23.

CUADRO 23. PARÁMETROS BIOQUÍMICOS Y FISICOQUÍMICOS DE His₆ - ansa II.

PARÁMETROS BIOQUÍMICOS.	
DETERMINACIÓN	MODIFICACIONES
Estabilidad en gradiente de temperatura.	Los valores de temperatura determinados para la reacción enzimática fueron 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 y 60 °C.
Estabilidad en gradiente de pH.	Se emplearon los amortiguadores de reacción a una concentración de 100 mM. Los amortiguadores empleados y el gradiente generado por cada uno de ellos se indican en el cuadro 24.
Parámetros cinéticos.	Se prepararon soluciones de ans a concentraciones de 0,1, 2, 5, 7.5, 10, 12.5, 15, 17.5, 20, 22.5, 25, 27.5, 30, 32.5, 35 y 40 mM. Se utilizó el gráfico de Lineweaver - Burk para obtener los valores de Km y Vmax.

Determinación de la actividad en presencia de metales divalentes.	Se prepararon soluciones a 1, 2 y 4 mM de los metales divalentes Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , NH_4^{2+} y Zn^{2+} , con el buffer de reacción de carbonatos 0.1 mM y asn 10 mM, Debido a que las concentraciones de 1 y 2 mM de los metales divalentes no precipitaron, se caracterizó este punto con dichas concentraciones.
Especificidad en presencia de análogos de asn.	Se emplearon los análogos de asn: D-asparagina, Ácido aspártico, D-glutamina, L-glutamina y β -aspartil hidroxamato en soluciones 10 mM.
Actividad específica en presencia de inhibidores.	Se utilizaron las soluciones del punto anterior en combinación con asn 10 mM.
Tipo de inhibición causada por productos y cálculo de sus constantes de inhibición.	Se prepararon las soluciones 0, 5, 10 y 20 mM de asn en en combinación con 0, 5, 10 y 15 mM de NH_4^{2+} y por otro lado Ácido aspártico. Las constantes de inhibición se determinaron según el método reportado por Segel, 1975.

CUADRO 24. AMORTIGUADORES DE REACCIÓN.

	ACETATOS	PIPES	FOSFATOS	CARBONATOS
	CH_3COOK	$\text{C}_8\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}_2\text{Na}_2$	Na_2CO_3	KH_2PO_4
pH	5.0 - 5.5	6.0 - 7.0	7.5 - 9.0	9.5 - 11

VI. OTROS MÉTODOS.**VI A. GEL DE AGAROSA AL 1 %**

Para observar el DNA preparamos geles de agarosa al 1% fundiéndola con solución amortiguadora TBE 1X (cuadro 25), agregamos 2 µl de bromuro de etidio (5 µg/ml) por cada 50 ml de agarosa preparada.

CUADRO 25. BUFFER TBE 1X

SOLUCIÓN	CONCENTRACIÓN
TRIS – BASE	44 Mm
Ácido Bórico	27 mM
EDTA	0.5 mM

La solución es ajustada a pH 8 con KOH.

Los geles fueron corridos en una cámara de electroforésis Horizon 58 (Life Technologies) a 100 volts con buffer TBE 1X.

VI B. EXTRACCIÓN DE DNA DE PLÁSMIDO MEDIANTE LÍISIS ALCALINA A MEDIANA ESCALA

(Ausebel et. al., 1994)₂

PROCEDIMIENTO

1. Inocular 50 µl de la cepa criopreservada de *E. coli* JM109 en un matraz con 100 ml de medio LB + Amp.
2. Incubar por 2 hrs a 37 °C.
3. Centrifugar 1 ml del cultivo en tubos eppendorf por 1min a 14,000 rpm. Repetir este paso por lo menos 3 veces en el mismo tubo.
4. Resuspender el sobrenadante con 100 µl de solución A (cuadro 26), agitar en vortex por 30 seg. Incubar en hielo por 5min.
5. Agregar 200 µl de solución B recién preparada, agitar en vortex por 30 seg. Incubar en hielo por 10 min.

6. Agregar 150 μ l de la solución C, agitar en vortex por 30 seg. e incubar en hielo por 15 min.
7. Centrifugar por 3 min a 14,000 rpm.
8. Sin retirar el sobrenadante agregar 200 μ l de fenol-cloroformo (1:1) y agitar en vortex por 1 min.
9. Centrifugar por 6 min a 14,000 rpm.
10. La fase acuosa colocarla en un tubo limpio y adicionar nuevamente 200 μ l de fenol-cloroformo (1:1), agitar en vortex por 1 min.
11. Centrifugar por 6 min a 14,000 rpm.
12. Separar la fase acuosa en un tubo nuevo y limpio, agregar 2 ½ volúmenes de etanol absoluto frío (1 ml), incorporar suavemente.
13. Incubar por 5 min a temperatura ambiente.
14. Centrifugar por 10 min a 14,000 rpm.
15. Decantar en vacío (dar un pulso en la centrifuga para retirar el etanol completamente) y dejar secar por 10' a 50 °C.
16. Resuspender en baño con 50 μ l de TRIS - EDTA (10 : 0.1 mM) por 10 min a 60 °C.
17. Agregar 150 μ l de acetato de sodio 4M a pH 6.0, incorporar suavemente e incubar por 1 hr a -20 °C.
18. Posteriormente centrifugar por 10 min a 14,000 rpm.
19. El sobrenadante pasarlo a un tubo limpio, agregar lentamente por la pared del tubo un volumen de isopropanol (200 μ l) e incorporar suavemente. Incubar en hielo 10 min.
20. Centrifugar por 10 min a 14,000 rpm.
21. Decantar el sobrenadante y agregar 50 μ l de etanol al 70 % y centrifugar por 1 min a 14,000 rpm.
22. Retirar el sobrenadante con vacío (dar un pulso en la centrifuga para retirar completamente el etanol) y secar por 10 min en baño de agua a 60 °C. CUIDADO, LA PASTILLA SE DESPRENDE FÁCILMENTE.

23. Resuspender la pastilla en agua o TRIS - EDTA (10 : 0.1 mM) en un volumen no mayor de 25 μ l, en baño por 10 min a 60 °C. Si son varios tubos del mismo plásmido se pueden juntar al final.

*NOTAS: En este paso se puede correr un gel de agarosa al 1 % para conocer la pureza y el tamaño del plásmido.

CUADRO 26. SOLUCIONES PARA EXTRACCIÓN DE PLÁSMIDO.

SOLUCIÓN	CONCENTRACIÓN
A	TRIS - EDTA (25 : 10 mM)
B	NaOH (10 N) - SDS (10%) (2 %: 5%)
C	CH ₃ COON (3M)

Se preparan por separado y se esterilizan por 20 min. La solución B se utiliza recién preparada y se desecha.

VI C. PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDO A PEQUEÑA ESCALA (Ausebel et. al., 1994).

PROCEDIMIENTO

1. Agregar 5 μ l de RNAasa por tubo, incorporar suavemente. Incubar por 30 min a 37 °C.
2. Agregar 500 μ l de la siguiente solución: PEG 8000 al 20% + NaCl 2.5 mM, incorporar suavemente e incubar en hielo por 1 hr.
3. Centrifugar por 8 min a 14,000 rpm. Decantar el sobrenadante en vacío y dar pulsos para retirarlo completamente.
4. Agregar 1 ml de etanol absoluto frío, incorporar suavemente y centrifugar por 3 min a 14,000 rpm, decantar en vacío y dar pulsos para retirar el sobrenadante completamente.
5. Repetir el paso No. 4.
6. Agregar 400 μ l de TRIS - EDTA (10:0.1 mM) y resuspender la pastilla en baño por 10 min a 60 °C.
7. Agregar 200 μ l de fenol - cloroformo y agitar en vortex por 1 min.

8. Centrifugar por 3 min a 14 000 rpm y el sobrenadante colocarlo en un tubo limpio.
9. Al fenol agregarle nuevamente 50 μ l de TRIS - EDTA (10 : 0.1 mM), agitar en vortex por 1 min y centrifugar en las mismas condiciones.
10. Los sobrenadantes se juntan y se agrega a ese tubo 200 μ l de fenol - cloroformo, agitar en vortex por 1 min y centrifugar por 3 min a 14,000 rpm.
11. La fase acuosa se coloca en un tubo limpio y adicionar nuevamente fenol-cloroformo (1:1), agitar en vortex por 1 min. ESTE PASO SE REPITE LAS VECES NECESARIAS HASTA QUE YA NO APAREZCA INTERFASE BLANCA DESPUÉS DE CENTRIFUGAR.
12. El sobrenadante colocarlo en un tubo limpio y agregar 150 μ l de cloroformo frío, agitar en vortex por 1 min y centrifugar por 3 min a 14,000 rpm.
13. Agregar 1/10 de volumen de Acetato de Sodio 4 M pH 6, agitar en vortex por 1 min, dar un pulso en la centrifuga para juntar todo el contenido.
14. Agregar un volumen de Isopropanol suavemente por la pared del tubo e incorporar lentamente, centrifugar por 7 min a 14,000 rpm.
15. Retirar el sobrenadante con vacío (dar un pulso en la centrifuga para retirar completamente el isopropanol) agregar 200 μ l de etanol al 70 % y centrifugar por 3 min a 14,000 rpm.
16. Retirar el sobrenadante con vacío y dar un pulso en centrifuga para retirar el sobrenadante completamente.
17. Secar la pastilla en baño por 10 min a 60 °C.
18. Resuspender la pastilla en agua o TRIS - EDTA (10 : 0.1 mM) en un volumen no mayor de 25 μ l, en baño por 10' a 60 °C.

***NOTAS:**

- A) Correr un gel de agarosa al 1 % para conocer la pureza y el peso del plásmido.
- B) Los volúmenes de las soluciones pueden variar según el tamaño de la pastilla, el tipo de plásmido y la densidad del DNA.

VI D. DIGESTIÓN DE pTrcHis A CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN *Bam*H1 y *Eco*R1

(Invitrogen).

PROCEDIMIENTO:

1. En un tubo eppendorf adicionar 1 μ g de DNA del plásmido pTrcHis A y mantener en hielo.
2. Adicionar 10% del volumen total del amortiguador de reacción 10X para cada enzima (que en este caso es el mismo amortiguador) aproximadamente 2 μ l.
3. Agregar 80 % del volumen total en agua.
4. Adicionar cada una de las enzimas de restricción al mismo tiempo (1 unidad / μ g de DNA) y se agita con la pipeta.
5. Se incuba durante 1 hr a 37 °C. Posteriormente se puede almacenar a - 20 °C.

VI E. PREPARACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES DE *E. coli* BL21 (DE3) (Ausebel et. al., 1994).

PROCEDIMIENTO:

1. Sembrar plaqueando con un asa bacteriológica en una caja de medio LB + Cm (50 μ g /ml) 50 μ l de la cepa *E. coli* BL21 (DE3).
2. Incubar por 2 hrs a 37 °C.
3. Inocular un matraz con 100 ml de medio LB líquido + Amp con una asada de células. Incubar durante 12 hrs a 37 °C.
4. Posteriormente, centrifugar el cultivo a 4,000 rpm durante 5 min a 4 °C.
5. Lavar las células con 100 ml de NaCl al 0.85 %.
6. Centrifugar nuevamente bajo las mismas condiciones.
7. Inocular en 1 L de medio SOB (cuadro27) un matraz fermbatch de 2 L a 0.02 D. O. A₆₀₀.
8. Incubar a 16 °C con agitación constante de 200 rpm tomando muestra cada hora para analizarla en el espectrofotómetro. Hasta alcanzar 0.6 D. O. A₆₀₀.
9. Posteriormente, se introduce el matraz en una cama de hielo por 10 min.

10. Centrifugar el cultivo durante 10 min a 4,000 rpm a 4 °C y decantar.
11. La pastilla se resuspende en 80 ml de buffer TB previamente enfriado en hielo.
12. Incubar en baño de hielo de hielo durante 10 min.
13. Repetir el paso 10.
14. Resuspender la pastilla en 20 ml de amortiguador TB (cuadro 28) previamente enfriado en hielo.
15. Agregar 1.5 ml de DMSO e incubar en baño de hielo durante 10 min.
16. Finalmente, alicuotear 1 ml del cultivo celular en tubos eppendorf nuevos y estériles.
17. Se criopreservan a -70 °C.

CUADRO 27. MEDIO SOB PARA PREPARACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES.

REACTIVO	CONCENTRACIÓN
Peptona de caseína	2 %
Extracto de levadura	0.5 %
NaCl	10 mM
KCl	2.5 mM
MgCl ₂	10 mM
MgSO ₄	10 mM

CUADRO 28. AMORTIGUADOR TB PARA CÉLULAS COMPETENTES.

SOLUCIÓN	CONCENTRACIÓN	MEZCLA
A	PIPES - KCl (10 mM - 250 mM)	80 %
B	MnCl ₂ . 4 H ₂ O (55 mM)	10 %
C	CaCl ₂ . 2 H ₂ O (15 mM)	10%

Se preparan por separado y se esterilizan por 20 min. La solución A se ajusta el pH a 6.7 con KOH.

VI F. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA TOTAL POR BRADFORD (Bradford, 1977).**PROCEDIMIENTO:**

1. Colocar en un tubo eppendorf 80 μ l de agua desionizada estéril.
2. Adicionar 20 μ l del extracto a cuantificar (esta proporción debe de conservarse siempre a 100 μ l).
1. Agregar 1 ml de solución Bradford (cuadro 29).
2. Reposar por 3 min y cuantificar a A_{595} .
3. Para la curva de calibración se utiliza 2, 4, 6, 8, 10, 15 y 20 μ l del stock de Albúmina Suero Bovino (BSA) 0.5 M y se continúa como indica el protocolo.

CUADRO 29. SOLUCIÓN DE BRADFORD.

REACTIVO	VOLÚMEN TOTAL
Azul de Bromofenol R-250	0.25 g
Etanol	100 ml
Ácido acético	20 ml
Agua	Aforar a 200 ml

VI G. PREPARACIÓN DE MEMBRANAS PARA DIÁLISIS.

1. Utilizar membranas de diálisis de celulosa SIGMA con capacidad de retención de proteína de masa molecular de 12,000 Da. Lavar las membranas durante 1.5 hrs en una solución de etanol al 50 % preparada con agua desionizada a 80 °C.
2. Enjuagar las membranas con agua desionizada por fuera y por dentro.
3. Lavar las membranas durante 20 min con agua desionizada en agitación suave sin calentar, repetir este paso por lo menos por 5 veces enjuagando las membranas por dentro y fuera con agua desionizada entre cada lavado.
4. Las membranas se pueden almacenar en agua desionizada a 4 °C.

VI H. GELES PARA ELECTROFORÉSIS DE POLIACRILAMIDA .

Preparar el gel en el orden que indica el cuadro 30:

CUADRO 30. PREPARACIÓN DE GEL DE ACRILAMIDA.

REACTIVO	CONCENTRACIÓN	V O L U M E N (m l)			
		SDS – PAGE 10 %		NATIVO – PAGE 7 %	
		CONC*	SEP*	CONC	SEP
30% Acrilamida : Bis Acrilamida	37.5 : 5.1	3.33	0.67	2.49	0.67
Amortiguador separador	Tris 0.5 M pH 8**	2.5	X	2.5	X
Amortiguador concentrador	Tris 0.2 M pH 6.5**	X	1.25	X	1.25
SDS	10%	0.2	.05		X
Persulfato de amonio	10 %	0.12	0.09	0.12	.09
TEMED	1%	0.012	0.009	0.012	0.009

* Son las fases del gel, CONC: concentrador, SEP: separador. ** ajustado con HCl.

El volumen está ajustado a 10 ml de solución. Se usa inmediatamente evitando la formación de burbujas dentro de la cámara y cuidadosamente sobre la solución de acrilamida concentradora agregar etanol para eliminar el oxígeno y generar un frente plano en el gel.

1. Después de que el gel polimerizó, colocar la cámara en el aparato de electroforésis.
3. Llenar el tanque de electroforésis con amortiguador de reserva (cuadro 31). La muestra se aplica en el carril deseado con volumen 1/1 del amortiguador muestra (cuadro 32).
3. Correr el gel en el amortiguador de reserva a 30 y 70 mAp en la fase concentradora y separadora, respectivamente.
4. Retirar el gel de las placas de electroforésis y teñirlo por dos horas con solución nueva (cuadro 33).

5. Desteñir por 12 hrs o por pulsos de 1 min en microondas a máxima potencia, inmerso completamente en la solución desteñidora (cuadro 34).

CUADRO 31. AMORTIGUADOR DE RESERVA .

REACTIVO	CONCENTRACIÓN
Glicina	192 mM
Tris	25 mM
SDS (*)	10 %

* sólo para SDS-PAGE. Se utiliza recién preparado.

CUADRO 32. AMORTIGUADOR MUESTRA.

REACTIVO	CONCENTRACIÓN
Amortiguador concentrador	25 % vol. total
Glicerol	20 %
Agua desionizada	0.02 %
Azul de bromofenol	55 % vol. total

Se almacena en alícuotas a – 20 °C.

CUADRO 33. SOLUCION TEÑIDORA

REACTIVO	VOLUMEN (ml)
Azul brillante R250	0.25 g
Metanol	125
Ácido acético glacial	25
Agua desionizada	100

CUADRO 34. SOLUCIÓN DESTIÑIDORA

REACTIVO	VOLUMEN (ml)
Metanol	100
Ácido acético glacial	100
Agua desionizada	800

ANEXOS.

ANEXO 1. VECTOR DE EXPRESIÓN pTrcHis A (Invitrogen).

El plásmido pTrcHis A (4.4 Kb) permite que los genes clonados en el sitio múltiple de clonación sean modificados durante la traducción al adquirir una secuencia de nucleótidos que codifica para un dominio de histidinas en el extremo 5' termina. Las proteínas recombinantes generadas por pTrcHis A tienen 6 histidinas en tandem en el HN3 terminal, lo que permite su posterior purificación por afinidad a una columna cargada de iones metálicos como el níquel (Fig. 27). La presencia de un promotor híbrido *trc* (triptofano - lac) y el antiterminador *rrB* permite elevados niveles de expresión de la secuencia de DNA clonada en el sitio múltiple de clonación. El plásmido también contiene una copia del gen *LacI^q* que codifica para la proteína del represor lac que junto con la resistencia a Amp, permiten su rápida selección.

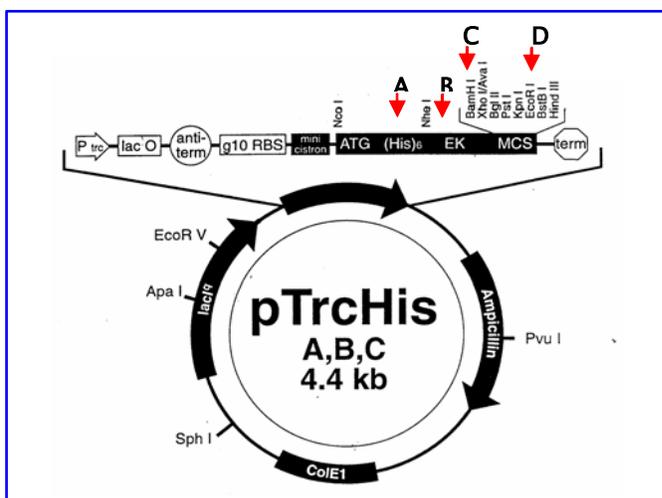


FIGURA 27. Vector de expresión pTrcHis A. A: Secuencia que codifica para 6 Histidinas. B: Región que codifica para el péptido líder. C y D: Región del sitio múltiple de clonación, donde están los sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción *Bam* H1 y *Eco* R1, respectivamente.

ANEXO 2. COLUMNA HI-TRAP CHELATING (Amersham Biosciences).

Esta columna está preempacada con 5 ml de Chelating Sepharose™ High Performance. Este sistema forma redes altamente cruzadas de agarosa acopladas con ácido diacético, que cuando es cargada con iones metálicos selectivamente retiene proteínas que contengan residuos de aminoácidos de reconocimiento expuestos en la superficie (Fig. 28).

Al cargar la columna con níquel reconocen y acompleja a las histidinas de la proteína His₆ – ansa II, favoreciendo específicamente la selección de las proteínas. Este sistema permite la eliminación del resto de las proteínas y eluir solamente a la proteína recombinante His₆ – ansa II.

El Imidazol es un agente estructuralmente similar a la histidina y al entrar en contacto con la columna compite por los sitios de unión a histidina. En concentraciones elevadas la competencia será muy fuerte favoreciendo la unión de imidazol y la consecuente elusión de la proteína His₆ – ansa II.

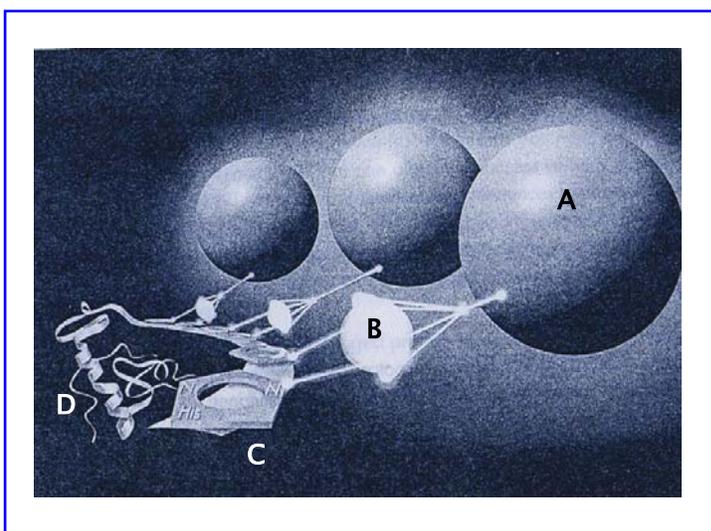


FIGURA 28. Complejo proteína – Histidinas unidos a la columna. A: Chelating Sepharose™ High Performance. B: Complejo Níquel - Histidinas. C. Tándem de Histidinas. D. Proteína asparaginasa II.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Asselin, B. L.** (1999). The tree asparaginases. Comparative pharmacology and optimal use in childhood leukemia. *Adv. Exp. Med Biol.* 457: 621–629.
2. **Asselin, B., Whitin, J., Coppola, D., Rupp– Sallan, S. and Cohen, H,** (1993) Comparative pharmacokinetics studies of three asparaginase preparations. *J. Of Clinical Oncology* 11: 1786 – 1789.
3. **Ausebel, F. M., Brent R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. And Strhl, K.** (1994). Current protocols in molecular biology. Ed. John Wiley and Sons, Inc. Volumen 1 y 2. USA.
4. **Avramis, V., Panosyan, E., Avramis, I., Martin–Aragon, S., Gaynon, P., Sather, H., Ettinger, L., Cohen, L. and Seibel, N.** (2002) Anti–asparaginase, antibody and ANSase activity in children with higher risk acute lymphoblastic leukemia. *J Clinical Oncol.* 1592.
5. **Beringer, J. E., Brewin, N., Johnson, A. B. W., Shulmsn, H. And Hopwood, D. A.** (1979). The *rhizobium*–legume symbiosus. *Proceedings of Royal Society of London.* 204: 219 – 233.
6. **Bio–Rad.** Whole gel eluter and mini whole gel eluter. Instruction manual. USA.
7. **Bonthron, D. T. y Jaskólski, M.** (1997). Why a “benign” mutation kills enzyme activity. Structure–based analysis of the A176V mutant of *Saccharomyces cerevisiae* L–asparaginase I. *Acta Biochim Pol.* 44:491 – 504.
8. **Borek, D. and Jaskólski, M.** (2001) Sequence analysis of enzymes with asparaginase activity. *Acta Biochemica Polonica* 48 : 893–901.
9. **Bradford, M. M.** (1977). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Anal Biochem.* 72:248 – 254.
10. **Bravo, A. And Mora, J.** (1988). Ammonium assimilation in *Rhizobium phaseoli* by the glutamine synthetase–glutamate synthetase pathway. *J. Bacteriol.* 179:980 – 984.
11. **Broome, J. D.** (1967) Studies on the mechanism of tumor inhibition by L–asparaginasa. Effects of the enzyme in asparagine levels in the blood, normal tissues and 6C3HED lymphomas of mice: Differences in asparagine formation and utilization in asparaginase–sensitive and resistant lymphoma cells. *J Exp. Med.* 127: 1055 – 1072.
12. **Bussolati, O., Silvana, B., Uggeri, J., Gatti, R., Orlandini, G., Dalli´Asta, V. y Gazzola, G.** (1995). Characterization of Apoptotic phenomena induced by treatment whit L–asparaginase in NIH3t3 cells. *Experimental Cell Research.* 220: 283 – 291.
13. **Callow, D. S., Capell, B. J. and Evans, C. G.** (1971). Experimental continuous culture production of the enzyme L–asparaginase by *Erwinia carotovora*. *J. Gen Microbiol.* 9: 165 – 172.
14. **Casado, A., Caballero, J., Franco, A. R., Cárdenas, J., Murray, R. G. and Muñoz–Blanco J.** (1995) Molecular cloning of the gene encoding the L–asparaginase gene of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 108:1321 – 1322.
15. **Castaman, G. and Rodheghiero, F.** (1993). *Erwinia* and *E. coli*– derived L–asparaginase have similar effects on hemostasis. Pilot study in 10 patient with acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica.* 78 (6 suppl 2): 57 – 60.
16. **Chaney, A. L. And Marbach, E. P.** (1962). Modified reagents for determination of urea and ammonia. *Clinical Chemistry.* 2: 130 – 132.
17. **Davidson, L., Burkom, M., Ahn, S., Chang, L. C. and Kitto, B.** (1977). L–asparaginases from *Citrobater freudii*. *Biochim Biophys Acta.* 480: 282 – 294.
18. **Distasio, J. A. and Niederman, R. A.** (1976). Purification and characterization of L–asparaginase with antiliphoma activity from *Vibrio succinogenes*. *J. Biol. Chem.* 251: 6929 – 6933.

19. Donahue R. A, Jr. And Bebee, R. L. (1999). BL21–SI competent cells for protein expression in *E. coli*. *Focus*. 21: 49 – 51.
20. Dunlop, P. C., Meyer, G. M. and Roon, R. J. (1980). Nitrogen catabolite repression of asparaginase II in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 143: 422 – 426.
21. Gallagher, M. P., Marshal, R. D. and Wilson, R. (1989) Asparaginase as a drug for treatment of acute lymphoblastic leukaemia. *Essays in Biochemistry* 24: 1 – 40.
22. Goldman, E., Rosenberg, A. H., Zubay, G. And Studier, F. W. (1995). Consecutive low.usage leucine cdons block translation only when near the 5´ end of message in *Eschecrichia coli*. *J. Mol. Biol.* 245: 467 – 473.
23. Harris, E. L. And Angal, S. (1990). Protein purification applications. A practical approach. 2da. Edición. Ed. IPL. Press. Nueva York.
24. Huerta–Saquero, A., Calderón, J., Arreguín, R., Calderón–Flores, A and Durán, S. (2001). Overexpression and purification of *Rhizobium etli* glutaminase A by recombinant and convencional procedures. A comparative study of enzymatic properties. *Protein Expression and Purification*. 21: 432 – 437.
25. Huerta–Zepeda, A., Durán, S., Du Pont, G. and Calderón, J. (1996). Asparagine degradation in *Rhizobium etli*. *Microbiology*. 142: 1071 – 1076.
26. Huerta–Zepeda, A., Ortuño, L., Du Pont, G., Durán, S., Lloret A., Merchant–Larios, H. and Calderón, J. (1997) Isolation and characterization of *Rhizobium etli* mutants altered in degradation of Asparagine. *J. Bac.*179: 2068–2072.
27. Hutson, R. G., Kiton, T., Moraga, A. D., Cosic, S., Schuter, S. M and Kiberg, M. S. (1997). Aminoacid control of asparagine synthetase: relation to asparaginase resistance in human leukemia cells. *Am. J. Physiol.* 272: C1691–C1699.
28. Imada, A., Igarasi, S., Nakahama, K. and Isono, M. (1973) Asparaginase and glutaminase activities of control microorganisms. *J Gen Microbiol* 76: 85 – 99.
29. Invitrogen. Xpress system™ protein expression pTrcHis. A manual of methods for expression of polyhistidine – containing recombinant proteins using the p TrcHis vector system. San Diego, California.
30. Jennings, M. P. and Beachman, I. R. (1993). Co–dependent positive regulation of the ansB promoter of *Escherichia coli* by CRP and FNR protein: a molecular analysis. *Mol Microbiol.* 9: 155 – 164.
31. Jennings, M. P., Anderson, J. k. and Beachman, I. R. (1995). Cloning and molecular analysis of the *Salmonella enterica asnP* gene, encoding an L–asparaginase permease. *Microbiology*. 141: 141 – 146.
32. Jennings, M. P., Scott, S., P. and Beacham, I. R. (1993) Regulation of the *ansB* gene of *Salmonella enterica*. *Mol Microbiol* 9: 165 – 172.
33. Kafkewitx, D. and Bendich, A. (1983). Enzyme–induced asparaginase and glutamine depletion and immune system function. *Am. J. Clin. Nutr.* 37: 1025–1030.
34. Kane, J. F. (1995). Effects of rare codons cluster on high–level expresiion of heterologous protein in *Escherichia coli*. *Current Op. Biotech.* 6:494 – 500.
35. Khan, M. L., Graus, J. y Somerville, J. E. (1985). A model nutrient exchange in the *Rhizobium* – legume symbiosis.. En H. Evans, P. Bottomley, W. E. Newton (Ed). Nitrogen Fixation Reserch Progress. M. J. Nijhoff. New York.
36. Kidd, J. D. (1953). Regression of transplanted lymphomas induced in vivo by means of normal guinea pig serum. Studies on the nature of the active serum constituent: histological mechanism of the regression: tests for effects of guinea pig serum on lymphoma cells in vitro. *J Exp Med.* 98:583–606.

37. **Kitto, G. B., Gale Smith., Tran-Quang, T., Mason, M. y Davidson, L.** (1979). Tumor inhibitory and non-tumor Inhibitory L-asparaginases from *Pseudomonas geniculata*. *Journal of Bacteriology*. 137: 204 - 212.
38. **Krasotkina, J. Borisova, A. A., Gervaziev, Y. V. and Sokolov, N. N.** (2004). One-step purification and kinetic properties of the recombinant L-asparaginase from *Erwinia carotovora*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 39: 215 - 221.
39. **Learth, S. A., Manso, G. G., Polakiewicz, B., Nogueira de Moraes, P. R. and Abrahao_Neto J.** (2002). Effects of polyethylene glycol attachment on physicochemical and biological stability of *E. coli* L-asparaginase. *International Journal of Pharmaceutics*. 237: 163 - 207.
40. **Lee, G. R., Bithell, T. C., Foerster, J., Athens, J. W. y Lukens, J. N.** (1993). Wintrobe Hematología clínica. Volumen 3, 9ª Edición. Ed. Interamericana. Argentina. Pag. 2081.
41. **Lenhinger, A. L., Nelson, D. L. Ans Cox, M. M.** (1993). Principles of Biochemistri. 2a Ed. Worth Publishers, Inc. USA.
42. **Manna, S., Sinha, A., Sadhukhan, R. and Chakrabarty, S. I.** (1995). Purification, characterization and antitumor activity of L-asparaginase isolated from *Pseudomonas stutzeri MB-405*. *Curr. Microbiol.* 30: 291 - 298.
43. **Mashburn, L.T. and Wriston, J. C. Jr.** (1964).Tumor inhibitory affect of l-asparaginase from *Escherichia coli*. *Arch. Biochem. Biophys.*105:450 - 452.
44. **Mashburn, L.T. and Wriston, J. C. Jr.** (1966). Change in ribonuclease concentrations in L-asparaginase-treated lymphosarcomata. *Nature*. 211: 1403 - 1404.
45. **Mawowski, A. S and Ramsby, M. L.** (1997). Protein molecular weight determination by sodium dodecyl sulfate polyacrilamide gel electrophoresis. In: A practical approach. 2da. Edición. Ed. T. E. Creightor. IPL. Press. Nueva York.
46. **Mesas, J. M., Gil, J. A. and Martin, J. F.** (1990). Characterization and partial purification of L-asparaginase from *Corynebacterium glutamicum*. *J Gen Microbiol.* 136:515 - 519.
47. **Miller, , R. and Stadman, E.** (1972). Glutamathe synthetase from *Escherichia coli*: an ironsulfide flavoprotein. *J. Biol. Chem.* 247: 7404 - 7411.
48. **Müller, H. J and Boos, J.** (1998). Use of L-asparaginase in Childhood ALL. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 28: 97 - 113.
49. **Noronkosnki, T., Stoineva, I., Ivanov, I., Petrov. and Mononen, I.** (1998). Glycosylasparaginase-catalyzed synthesis and Hydrolysis of β -aspartyl peptides. *The Journal of biological chemistry*. 41: 26295 - 26297.
50. **Ortuño, O. L. y Durán, V. S.** (2000) Las asparaginastas de microorganismos y su uso clínico. *Boletín de Educación Bioquímica*. 2000. 19. (1): 9 - 15.
51. **Ortuño-Olea, L and Durán-Vargas, S.** (2000). The L-asparagine operon of *Rhizobium etli* contain a gene encoding an atypical asparaginase. *FEMS Lett.* 189:177 - 182. Cedar, H. and Schwartz J. H. (1968). Production of L-asparaginase II by *Escherichia coli*. *J. Bactriol.* 96: 2043 - 2048.
52. **Padmakumar, V. C. and Varandarajan, R.** (2003). A gradiente PCR-based creen for use in site-direct mutagenesis. *Analytical Biochemistry*. 314:310 - 315.
53. **Paul, J. H.** (1982). Isolation and characterization of a Chlamydomonas L-asparaginase. *Biochem. J.* 203: 109 - 115.
54. **Pharmacia LKB Biotechnology.** IEF and electrophoresis titration curve analysis. Separation Technique File No. 100. PhastSystem™.
55. **Pritsa A. A. and Dimitrios, A. K.** (2001). L-asparaginase of *Thermus thermophilus*: purification, properties and identification of essential amino acids for its catalytic activity. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 216: 93 - 101.

56. Pritsa, A. A., Papazisis, K. T., Kortsaris, A. H., Geromichalos, G. D. and Kyriadis, D. A. (2001). Antitumor activity of L-asparaginase from *Thermus thermophilus*. *Anti-Cancer Drugs*. 12: 137 – 142.
57. Reichbach, P. H. and Steeter, J. G. (1983). Metabolism of ¹⁴C labelled photosynthate distribution of enzymes of glucose metabolism in soybean nodules. *Plant Physiol*. 72: 634 –640.
58. Rosenberg, A. H., Goldman, E., Dunn, J. J., Studier, F. W. And Zubay, G. (1993). Effects of consecutive AGG codons on translation in *Escherichia coli* demonstrated with a versatile codon test system. *J. Bact.* 175: 716 – 722.
59. Scopes, R. K. (1988). Protein purification. Principles and practice. 2da Ed. Ed. Springer-Verlag. USA.
60. Segel, I. H. (1975). Enzyme Kinetics: Behavior and analysis of rapid-equilibrium and ateady-satate enzyme system. Wiley, New York.
61. Sieciechowicz, K. A., Joy, K. W. and Ireland, R. J. (1988) The metabolism of asparagine in plants. *Phytochem*. 27 : 663–671.
62. Silverman, L., Levy, D., Dalton, V., Asselin, B., Barr, R., Clavell, L., Hurwitz, C., Moghrabi, A., Samson, Y., Schorin, M., Gelber, R. and Sallan, S. (2002). *Erwinia* L-asparaginase is less toxic and less effective than *E. coli* L-asparaginase in children whit newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia. *J American Society of Clinical Oncol*. 1554.
63. Sobis, M. and Mikucki, J. (1991). Staphylococcal L-asparaginase: enzyme kinetics. *Acta Microbiol. Pol.* 40: 143 – 152.
64. Stams, W., den Boer, M., Berna-Beverloo, H., Meijeink, J., Stingter, R., Van Wering, E., Janka – Schaub, E., Slater, R. and Pitter, R. (2003). Sensitive to L-asparaginase is not associated with expression levels of asparagine synthetase in t(12;21)+ pediatric ALL. *Blood*. 101: 2743 – 2747.
65. Stratagene. BL21 (DE3) Competent Cells, BL 21 (DE3) pLysS Competent cells and BL21 compettent cells. La Jolla, California.
66. Sun, D. and Setlow, P. (1993). Cloning and nucleotide sequence of the *Bacillus subtilis* ansR gene, which encodes a repressor of the ans operon coding for L-asparaginase and L-aspartase. *J Bacteriol*. 175:2501 – 2506.
67. Sun, D. y Setlow, P. (1991) Cloning, nucleotide sequence and expression of the *Bacillus subtilis* ans operon, wich codes for L-aspartase. *J. Bacteriol* 175 : 2501 – 2506.
68. Swain, A. L., Jaskólski, M., Housset, D., Rao M. and Wlodawer, A. (1993). Crystal structure of *Escherichia coli* L-asparaginase, an enzyme used in cancer therapy. *Biochemistry*. 90: 1474 – 1478.
69. Takagi, J. S. Tokushige, M. and Shimura, Y. (1986). Cloning and nucleotide sequence of the aspartase gene of *Pseudomonas fluorescens*. *J. Biochem* 100: 697 – 705.
70. Tiwari, N. and Gua, R. D. (1996). Purification and preliminary characterization of L-asparaginase from *Erwinia aroideae* NRRL B-138. *Indian J. Biochem. Biophys*. 33: 371 – 376.
71. Triantafillou, D. J., Georgatsos, J. G. and Kyriakidis. (1988). Purification and properties of a membrane-bound L-asparaginase of *Tetrahymena pyriformis*. *Mol Cell Biochem*. 81:43 – 51.
72. Tsavdaridis I. K., Triantafillidou, D. C. Kyriakidis, D. A. (1994). Two forms of L-asparaginase in *Tetrahymena thermophila*. *Biochem. Mol. Biol. Int*. 32: 67 – 77.
73. Ueno, T., Ottawa, K., Mitsui, K., Koder, Y., Hiroto, M., Matsushima, A., Imada, Y. and Nishimura, H. (1997). Cell cycle arrest and apoptosis of leukemia cells induced by L-asparaginase. *Leukemia*. 11: 1858 – 1861.
74. w. w. w. filaxis. com
75. <http://NCBI.nlm.nih.gov/>
76. <http://pegasus.uthct.edu/ResUTHCT/Investigators/Sblack/codonuse.html>.