



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**SOBREEXPRESIÓN DE LA ENZIMA
BETAÍNA ALDEHÍDO DESHIDROGENASA
DE HOJA DE *Amaranthus hypochondriacus***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

Q U Í M I C O

P R E S E N T A

ARMANDO CÁZARES ROBLES



MÉXICO, D.F. 2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

JURADO ASIGNADO

Presidente	Dra. Rosario Adelaida Muñoz Clares
Vocal	Dr. Rogelio Rodríguez Sotres
Secretario	Dr. Eleazar Martínez Barajas
1^{er} Suplente	Dr. Francisco Javier Plasencia de la Parra
2^o Suplente	Dr. Euclides Ávila Chávez

Sitio en donde se desarrolló el tema

Departamento de Bioquímica, Edificio de Bioquímica y Farmacia, Laboratorio 102,
Conjunto E, Facultad de Química, UNAM.

Asesora del tema: Dra. Rosario A. Muñoz Clares _____

Supervisor técnico: Biol. Carlos Mújica Jiménez _____

Sustentante: Armando Cázares Robles _____

PATRI·MEO·ET·MATRI·MEAE·
SORORIBVS·MEIS·ET·FRATRIBVS·MEIS·
UNIVERSITATIMEAE·ET·MAGISTRIBVS·MEIS·

Agradecimientos

A mis padres, **Dr. Armando Cázares C.** y **Dra. Elsa Robles G.** por su infinito cariño y por su apoyo incondicional.

A mis hermanas **Anel** y **Tania** por ser mis compañeras de juego, mis cómplices y mis amigas desde siempre.

A mis **familiares** que siempre creyeron en mi y que constantemente me brindaron su apoyo y cariño.

A mi colegio, el Colegio Morelos de Cuernavaca por la educación que ahí recibí y particularmente a la profesora **Guadalupe Pensado L.** por introducirme al fascinante mundo de la Química.

A mis **amigos** Alejandra Alonso C., Alejandro Álvarez R., Sandra Bojórquez G., Marcus Cobián F., Álvaro Contreras V., Manuel Perdomo Y. y Tania Tagle S., por compartir sus vidas conmigo.

A mi querida amiga **Susan Caballero L.** por todo lo que hemos vivido juntos, por escucharme cuando lo necesito, por todas las risas compartidas y por todas las cosas que me ha enseñado.

A mis **profesores de la Olimpiada de Química** y a la **Academia Mexicana de Ciencias** por la maravillosa experiencia que fue participar en las Olimpiadas de Química.

A mis **amigos olímpicos** Vicente Arbesú L., Mario Delgado J., Juan Escamilla A., Carlos Jiménez H. y J. Miguel Ramos P., por los gratos momentos compartidos.

A mi buena amiga **Margarita Arizmendi R.** por permitirme ser su amigo desde la preparatoria, en la olimpiada y durante nuestro tiempo en la universidad.

A mis queridos amigos químicos **Javier Borau G., Ma. Fernanda Jiménez S.** y **Roberto Olivares A.** por demostrarme que los excelentes compañeros también pueden ser excelentes amigos, y con quienes ha sido un placer y un honor tener a mi lado durante estos años.

A mi gran amigo, **M. en C. Rigoberto Real M.** por todo el tiempo que ha estado a mi lado, por todas las experiencias que hemos compartido y por su apoyo constante.

A mi facultad, la **Facultad de Química**, y a todos los buenos profesores con los que he tenido el gusto de tomar clases, especialmente al **Dr. Andoni Garritz R.** por ser el primer profesor en confiar en mí.

A mi coordinadora de carrera, la **Dra. Elvira Santos S.** y a la **M. en I. Ma. Eugenia Lugo L.**, así como a **Teresa Cianca O.** y a la **DGEP** por darme la oportunidad de realizar el intercambio en la Universidad de Toronto, así como a los profesores y amigos en esta universidad.

A mi asesora, la **Dra. Rosario Muñoz C.** por recibirme en su laboratorio, por su siempre amable y a la vez estricta supervisión, y por todas sus muy valiosas enseñanzas.

A mi supervisor técnico, el **Biol. Carlos Mújica J.** por su paciencia, por sus consejos y por toda su ayuda en mi trabajo en el laboratorio.

A mis supervisores en el CEIB, el **Dr. Gabriel Iturriaga de la F.** y el **Dr. Ramón Suárez R.** por recibirme en su laboratorio, por los plásmidos que tan amablemente nos obsequiaron y por el trato tan amigable que ahí recibí.

A mi supervisor en la Facultad de Medicina, **Dr. Ismael Bustos J.** por obsequiarme los plásmidos con las chaperonas y por permitirme realizar parte de este trabajo en su laboratorio.

A los **honorables miembros del jurado:** Dra. Rosario Muñoz C., Dr. Rogelio Rodríguez S., Dr. Eleazar Martínez B., Dr. Fco. Javier Plasencia de la P. y Dr. Euclides Ávila C., por sus valiosas observaciones y por su orientación en la elaboración de esta tesis.

A la **M. en C. Teresa Unda C.** del Departamento de Exámenes Profesionales por su gran ayuda en esta etapa de la licenciatura.

A mis **amigos más antiguos de la facultad** Rocío Morín O., Yanis Toledano M., y Oliver Walls F. por ofrecerme su amistad desinteresada desde el principio.

A todos mis **amigos de la facultad de Química**, especialmente a Ana P. Acosta S., Ma. del Pilar Aliaga C., E. Paola Arévalo L., Fernando Belmont B., Magda Esquivel P., Liliana Gómez P., Enrique Jiménez R., J. Mauricio Maya G., Pedro Navarro P., Alexandra Pérez-Bolde V., Daniel Talancón S. y Rebeca Vieto P. por compartir conmigo más que la Química.

A mis compañeros y a mis amigos de los diferentes laboratorios por compartir sus experiencias conmigo, por sus consejos y por facilitar en gran medida mi trabajo.

Agradezco especialmente al **CONACyT** por el apoyo brindado a lo largo de toda la licenciatura.

México, D.F., 5 de junio de 2007

Armando Cázares Robles

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	9
ÍNDICE DE TABLAS.....	12
ABREVIATURAS	13
1. INTRODUCCIÓN.....	16
2. ANTECEDENTES.....	22
2.1. Las aldehído deshidrogenasas.....	22
2.1.1 Las betaína aldehído deshidrogenasas	26
2.1.1.1. La betaína aldehído deshidrogenasa de hoja de amaranto ...	32
2.2. Ingeniería genética	38
2.2.1 Clonación molecular.....	38
2.2.1.1. Vectores de clonación	39
2.2.1.2. Ensamble de genes	41
2.2.1.3. Selección de células transformadas	43
2.2.2. Producción de proteínas recombinantes	46
2.2.2.1. Inducción de la síntesis de proteínas	48
2.2.2.2. Cuerpos de inclusión.....	54
3. OBJETIVO GENERAL	59
3.1. Objetivos particulares	59
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	60
4.1. Materiales.....	60
4.1.1. Material biológico.....	60
4.1.2. Equipo	61
4.1.3. Reactivos	61
4.1.3.1. Merck.....	61

4.1.3.2.	Sigma-Aldrich	62
4.1.3.3.	Otros	62
4.2.	Métodos	63
4.2.1.	Determinación de la actividad AhyBADH	63
4.2.2.	Determinación de proteína	64
4.2.3.	Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida	64
4.2.4.	Sobreexpresión de la AhyBADH en células de <i>E. coli</i> transformadas con pBKS- <i>ahybadh</i>	66
4.2.5.	Solubilización y repliegue de los cuerpos de inclusión	67
4.2.6.	Transformación de células de <i>E. coli</i> previamente transformadas con pBKS- <i>ahybadh</i> con vectores que contienen chaperonas de <i>P. aeruginosa</i>	68
4.2.7.	Sobreexpresión de la AhyBADH en células de <i>E. coli</i> co-transformadas con pBKS- <i>ahybadh</i> y con vectores con chaperonas de <i>P. aeruginosa</i>	68
4.2.8.	Electroforesis en geles de agarosa	69
4.2.9.	Inserción del gen <i>ahybadh</i> de hoja de amaranto en pRS6 a partir de pBKS- <i>ahybadh</i>	70
4.2.10.	Transformación de células de <i>S. cerevisiae</i> con pRS6- <i>ahybadh</i>	73
4.2.11.	Inserción del gen <i>ahybadh</i> en pSAL3 a partir de pRS6- <i>ahybadh</i>	74
4.2.12.	Transformación de células de <i>S. cerevisiae</i> con pSAL3- <i>ahybadh</i>	75
4.2.13.	Sobreexpresión de la AhyBADH en células de <i>S. cerevisiae</i> transformadas con pSAL3- <i>ahybadh</i>	77

5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	78
5.1.	Sobreexpresión de la AhyBADH en células de <i>E. coli</i> transformadas con pBKS- <i>ahybadh</i>	78
5.2.	Solubilización y repliegue de los cuerpos de inclusión	87
5.3.	Transformación de células de <i>E. coli</i> previamente transformadas con pBKS- <i>ahybadh</i> con vectores que contienen chaperonas de <i>P. aeruginosa</i>	90
5.4.	Sobreexpresión de la AhyBADH en células de <i>E. coli</i> transformadas con pBKS- <i>ahybadh</i> y un vector con tres chaperonas de <i>P. aeruginosa</i>	92
5.5.	Inserción del gen <i>ahybadh</i> en pRS6 a partir de pBKS- <i>ahybadh</i>	95
5.6.	Transformación de células de <i>S. cerevisiae</i> con pRS6- <i>ahybadh</i>	98
5.7.	Inserción del gen <i>ahybadh</i> en pSAL3 a partir de pRS6- <i>ahybadh</i>	100
5.8.	Transformación de células de <i>S. cerevisiae</i> con pSAL3- <i>ahybadh</i>	100
5.9.	Sobreexpresión de la AhyBADH en células de <i>S. cerevisiae</i> transformadas con pSAL3- <i>ahybadh</i>	102
6.	CONCLUSIONES	106
7.	PERSPECTIVAS	107
8.	REFERENCIAS	108

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de algunos de los osmoprotectores más comunes.....	18
Figura 2. Biosíntesis de glicina betaína en el cloroplasto.....	20
Figura 3. Reacción general catalizada por las aldehído deshidrogenasas.....	23
Figura 4. Estructura química de algunos de los aldehídos aceptados por las ALDHs.	23
Figura 5. Esquema del mecanismo químico propuesto para la reacción catalizada por las ALDHs no fosforilantes.	25
Figura 6. Relaciones filogenéticas de enzimas con actividad BADH y/o aminoaldehído deshidrogenasa	28
Figura 7. Modelo tridimensional de la BADH de <i>P. aeruginosa</i>	31
Figura 8. Reacción catalizada por la AhyBADH.....	33
Figura 9. Modelo tridimensional de la AhyBADH.....	33
Figura 10. Esquema del mecanismo cinético de la AhyBADH.....	34
Figura 11. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos codificadas por los genes <i>ahybadh4</i> y <i>ahybadh17</i>	36
Figura 12. Esquema de la reacción en cadena de la polimerasa.	43
Figura 13. Reacción de la β -galactosidasa con X-gal.	44
Figura 14. Hidrólisis de la lactosa.....	48
Figura 15. Operón <i>lac</i>	49
Figura 16. Estructura de dos de los inductores del operón <i>lac</i>	51
Figura 17. Esquema de la mutagénesis sitio-dirigida.	53
Figura 18. Micrografía electrónica de cuerpos de inclusión de <i>E. coli</i>	55
Figura 19. Esquema del plásmido pBKS.	70
Figura 20. Esquema del vector pRS6 para levadura.	72

Figura 21. Esquema del vector pSAL3 para levadura.	74
Figura 22. Diagrama de la preparación del extracto libre de células de <i>E. coli</i> transformadas con pBKS- <i>ahybadh</i>	79
Figura 23. SDS-PAGE de extractos libres de células de <i>E. coli</i> transformadas con el plásmido pBKS- <i>ahybadh</i>	80
Figura 24. Posibles orientaciones del gen <i>ahybadh</i> en pBKS- <i>ahybadh</i>	81
Figura 25. Gel de agarosa mostrando los productos de la digestión de pBKS- <i>ahybadh</i>	83
Figura 26. Polipéptidos que se producirían si ocurriese un cambio de marco de lectura por supresión de una o dos bases en la secuencia nucleotídica del gen <i>ahybadh</i>	84
Figura 27. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las BADHs de hoja de amaranto y de espinaca.	86
Figura 28. Modelo de la estructura tridimensional de la AhyBADH generado a partir de la secuencia de aminoácidos.	87
Figura 29. SDS-PAGE de los extractos libres de células de <i>E. coli</i> transformadas con el plásmido pBKS- <i>ahybadh</i>	88
Figura 30. Solubilización de los cuerpos de inclusión.	89
Figura 31. SDS-PAGE del lavado y solubilización de los cuerpos de inclusión.	90
Figura 32. Diagrama de la co-transformación de células de <i>E. coli</i> con pBKS- <i>ahybadh</i> y un vector con una chaperona.	91
Figura 33. Diagrama de la co-transformación de células de <i>E. coli</i> con pBKS- <i>ahybadh</i> y un vector con tres chaperonas.	92

Figura 34. Diagrama de la preparación del extracto libre de células de <i>E. coli</i> transformadas con pBKS- <i>ahybadh</i> y un vector con 3 chaperonas de <i>P. aeruginosa</i>	94
Figura 35. SDS-PAGE de la co-expresión de la AhyBADH y chaperonas de <i>P. aeruginosa</i>	95
Figura 36. Gel de agarosa mostrando los productos de la digestión simultánea de pBKS- <i>ahybadh</i> con <i>XhoI</i> y <i>NotI</i>	97
Figura 37. Gel de agarosa usado de la determinación de las concentraciones relativas del vector pRS6 y el inserto <i>ahybadh</i>	97
Figura 38. Gel de agarosa del producto de la digestión con <i>XhoI</i> y <i>NotI</i> del vector pRS6- <i>ahybadh</i>	98
Figura 39. Diagrama de la transformación de <i>S. cerevisiae</i> con pRS6- <i>ahybadh</i>	99
Figura 40. Diagrama de la transformación de <i>S. cerevisiae</i> con pSAL3- <i>ahybadh</i> ..	101
Figura 41. Gel de agarosa de la digestión con <i>XhoI</i> y <i>NotI</i> del DNA plasmídico de células de <i>S. cerevisiae</i> transformadas con pSAL3- <i>ahybadh</i>	101
Figura 42. Diagrama de la preparación del extracto libre de células de <i>S. cerevisiae</i> transformadas con pSAL3- <i>ahybadh</i>	102
Figura 43. SDS-PAGE del extracto libre de células de <i>S. cerevisiae</i> transformadas con pSAL3- <i>ahybadh</i> . extracto de células transformadas con pSAL3- <i>ahybadh</i>	105

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Estrategias para replegar y recuperar proteína a partir de cuerpos de inclusión bacterianos.....	58
Tabla 2. Reactivos necesarios para la preparación de un gel para SDS-PAGE.....	65
Tabla 3. Tamaños hipotéticos de los fragmentos que se obtendrían en el análisis de restricción de pBKS- <i>ahybadh</i> con <i>SacI</i> y <i>SalI</i>	82
Tabla 4. Actividad NAD ⁺ reductasa de los sobrenadantes de los extractos de células de <i>S. cerevisiae</i> transformadas con pSAL3- <i>ahybadh</i> y pSAL3, sin inducir e inducidas con Cu(II), a 4 y 20 horas de inducción.	103

ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
<i>A. hypochondriacus</i>	<i>Amaranthus hypochondriacus</i>
AGNC	ALDH Gene Nomenclature Committee
AhyBADH	Betaína aldehído deshidrogenasa de hoja de <i>A. hypochondriacus</i>
<i>ahybadh</i>	Gen que codifica para la AhyBADH
ALDH	Aldehído deshidrogenasa
Amp	Ampicilina
<i>amp</i> ^R	Gen que confiere resistencia a la ampicilina
BA	Betaína aldehído
BADH	Betaína aldehído deshidrogenasa
bp	Pares de bases
BSA	Albúmina sérica bovina
cDNA	DNA complementario
CMO	Colina mono-oxigenasa
CTAB	Bromuro de cetil,trimetil-amonio
<i>cup1</i>	Gen promotor que codifica para una metalotioneína
<i>cycl</i>	Gen terminador que codifica para iso-1-citocromo c
dATP	Trifosfato de desoxiadenosina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Trifosfato de desoxinucleósido
DTE	Ditioeritritol
DTT	Ditiotreitol
dTTP	Trifosfato de desoxitimidina
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido etilén diamino tetraacético
EGTA	Ácido etilén glicol tetraacético
ExPASy	Expert Protein Analysis System
GABA	Ácido γ -amino-butírico
Gdn-HCl	Cloruro de guanidinio
HEPES	Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il]etansulfónico
<i>his3</i>	Gen auxotrófico a histidina

IPTG	β -D-isopropiltiogalactósido
kb	Kilo bases
kDa	Kilo Daltons
<i>lac</i>	Operón de la lactosa
<i>lacA</i>	Gen que codifica para la transacetilasa del sistema de la lactosa
<i>lacI</i>	Gen que codifica para el represor del sistema de la lactosa
<i>lacY</i>	Gen que codifica para la lactosa permeasa
<i>lacZ</i>	Gen que codifica para la β -galactosidasa
LB	Luria-Bertani
MCS	Sitio de clonación múltiple
MES	Ácido 2-(<i>N</i> -morfolino)etansulfónico
mRNA	RNA mensajero
NAD ⁺	Dinucleótido de nicotinamida y adenina (forma oxidada)
NADH	Dinucleótido de nicotinamida y adenina (forma reducida)
NADP ⁺	Dinucleótido de nicotinamida y adenina fosfato (forma oxidada)
NADPH	Dinucleótido de nicotinamida y adenina fosfato (forma reducida)
NCBI	National Center for Biotechnology Information
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
pBKS- <i>ahybadh</i>	El gen <i>ahybadh</i> en el vector pBKS
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
<i>pma1</i>	Gen promotor que codifica para la ATPasa de protones
PMSF	Fluoruro de fenilmetansulfonilo
pRS6- <i>ahybadh</i>	El gen <i>ahybadh</i> en el vector pRS6
pSAL3- <i>ahybadh</i>	El gen <i>ahybadh</i> en el vector pSAL3
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SD	Definido sintéticamente
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS
SIB	Swiss Institute of Bioinformatics
SOC	Medio catabolizador super óptimo
TAE	Tris-Acético-EDTA

<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
Tc	Tetraciclina
Tris	Tris-hidroximetil-aminometano
U	Unidades de actividad enzimática
<i>ura3</i>	Gen auxotrófico a uracilo
UV	Ultra Violeta
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactósido
YAC	Cromosoma artificial de levadura
YNB	Base nitrogenada sólida sin aminoácidos para levadura
YPD	Extracto de levadura, peptona y dextrosa



Emerging/Ana Cázares

1. INTRODUCCIÓN

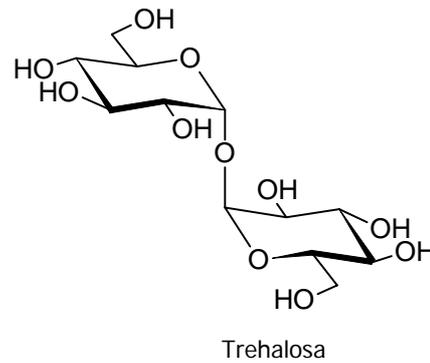
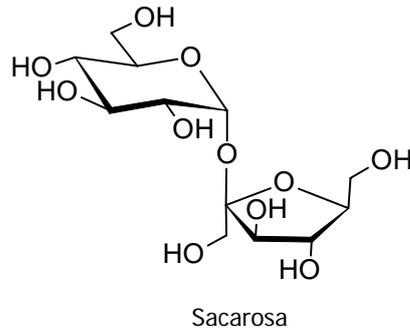
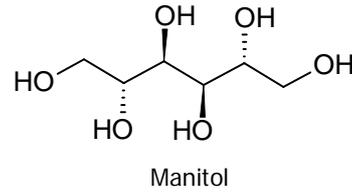
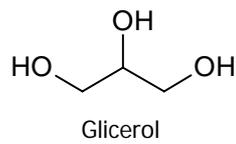
La agricultura en la actualidad enfrenta un problema de gran importancia que es la baja productividad debida a la gran cantidad de suelos que están sometidos a períodos prolongados de sequía o que no pueden cultivarse a causa de la acumulación de sales, producto de prácticas agrícolas inadecuadas como el abuso de fertilizantes o la alta irrigación. Tales condiciones ambientales ocasionan en las plantas un fenómeno conocido como **estrés osmótico**, en el cual las células vegetales pierden agua, lo que repercute directamente en la productividad.

Una de las respuestas metabólicas al estrés osmótico es la síntesis de compuestos eléctricamente neutros, de baja masa molar y que sean compatibles con el metabolismo de la célula (Yancey *et al.*, 1982) los cuales, en conjunto, reciben el nombre de **solutos compatibles**, **osmolitos** u **osmoprotectores**. La acumulación de

osmoprotectores en el citoplasma en concentraciones de moderadas a altas incrementa la presión osmótica celular interna y la iguala con la del medio externo para evitar una mayor pérdida de agua; además, son capaces de estabilizar estructuras proteicas y membranales.

Los osmoprotectores incluyen una gran variedad de compuestos como alcoholes polihidroxilados, carbohidratos, aminoácidos, betaínas y compuestos relacionados. Algunos de los osmoprotectores más comunes son el glicerol, el manitol, la sacarosa, la trehalosa, la prolina, la glicina, la prolina betaína, la glicina betaína, la β -alanina betaína y algunos compuestos análogos como la colina-*O*-sulfato y el 3-dimetilsulfoniopropionato (DMSP) (Figura 1) (Arakawa & Timasheff, 1985; Rhodes & Hanson, 1993).

Alcoholes polihidroxilados y carbohidratos



Aminoácidos, betaínas y compuestos relacionados

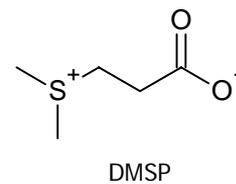
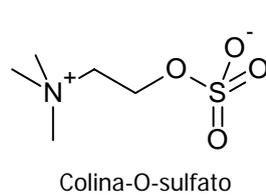
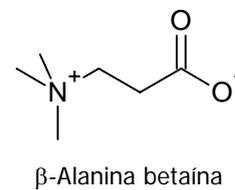
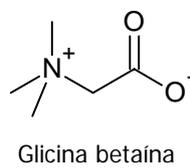
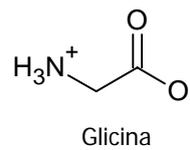
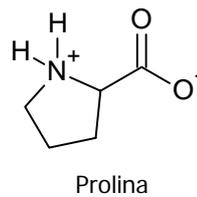


Figura 1. Estructura de algunos de los osmoprotectores más comunes.

La **glicina betaína** (*N,N,N*-trimetil glicina) es un compuesto de amonio cuaternario que se sintetiza y acumula en respuesta a estrés osmótico en ciertas bacterias, algas, hongos, animales y varias familias de plantas (Rhodes & Hanson, 1993), pero no así en muchas especies de plantas para cultivo. Además, la glicina

betaína es el osmoprotector más eficiente que se produce en la naturaleza (Courtenay *et al.*, 2000).

Una de las plantas que sintetizan y acumulan glicina betaína es el amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*), una gramínea muy resistente a la sequía y de gran interés agrícola debido al alto contenido proteico de sus semillas, las cuales son usadas ampliamente como parte de la dieta mexicana. Esto hace del amaranto un modelo interesante para estudiar las bases moleculares de la respuesta al estrés osmótico, ya que en el caso de las plantas, la glicina betaína es un blanco potencial de ingeniería metabólica debido a que, como ya se mencionó, muchas plantas de interés agrícola no tienen la capacidad de sintetizar este potente osmoprotector.

Estudios genéticos en plantas y bacterias han mostrado que la presencia de glicina betaína se correlaciona con una tolerancia al estrés osmótico (Grumet & Hanson, 1986; Styrvold *et al.*, 1986; Saneoka *et al.*, 1995) y además se ha demostrado que en concentraciones desde 0.7 M hasta 2 M, la glicina betaína no es tóxica para las enzimas en el citoplasma (Arakawa & Timasheff, 1983), pues estabiliza sus estructuras proteicas y, al quedar excluida del dominio de la proteína, es improbable su unión directa a las mismas.

En aquellas plantas capaces de acumular glicina betaína, la síntesis de este osmoprotector se realiza en el cloroplasto a partir de colina que se importa del citosol y consiste en dos pasos sucesivos de oxidación catalizados por la colina mono-oxigenasa (CMO, EC 1.14.15.7), una enzima dependiente de ferredoxina (Brouquisse *et al.*, 1989; Burnet *et al.*, 1995), y por la **betaína aldehído deshidrogenasa** (BADH, EC 1.2.1.8) NAD⁺-dependiente (Weigel *et al.*, 1986), respectivamente, como se muestra en la Figura 2.

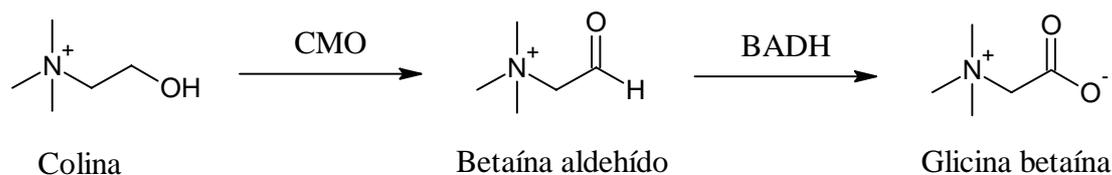


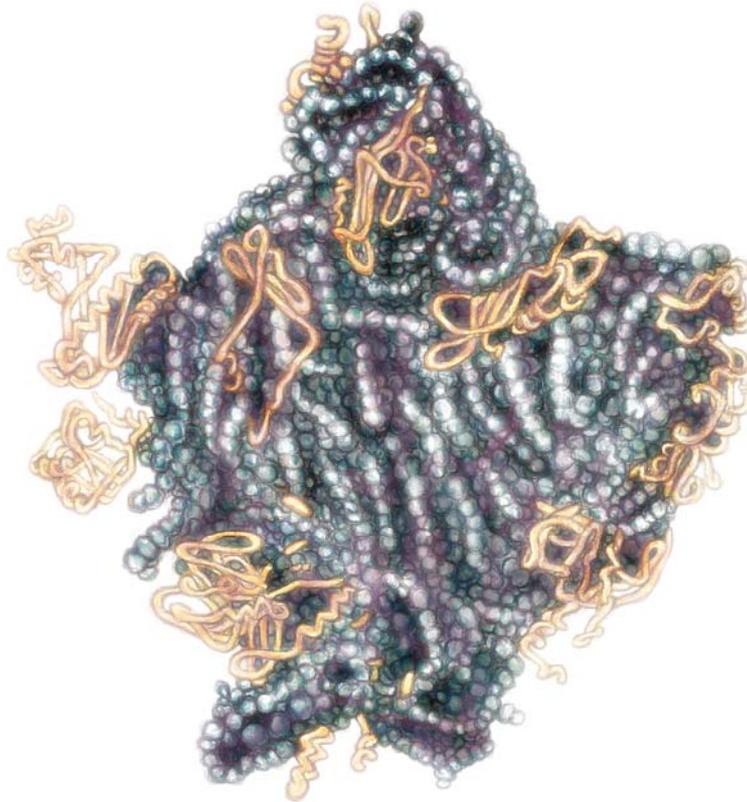
Figura 2. Biosíntesis de glicina betaína en el cloroplasto.

Las BADHs se encuentran en una gran variedad de organismos, desde bacterias hasta mamíferos y plantas, lo cual refleja la importancia de la función o las funciones fisiológicas de esta actividad enzimática. Varias plantas de interés agrícola como el maíz, el frijol, la papa, el tomate, o el arroz, no tienen la capacidad de sintetizar glicina betaína (Weretilnyk *et al.*, 1989; McCue & Hanson, 1990), lo cual las hace objetivos potenciales importantes para la ingeniería genética de una ruta metabólica que conduzca a la producción del osmoprotector (McCue & Hanson, 1990).

La mayoría de los reportes acerca del diseño metabólico de mejoramiento de la tolerancia a estrés osmótico que están disponibles actualmente son sobre el tabaco y otros cultivos incapaces de producir glicina betaína. En ellos se intenta incorporar el gen *badh*, clonado a partir de bacterias o de plantas, a plantas que no tienen la capacidad, de sintetizar y acumular glicina betaína produciendo plantas transgénicas con una mayor tolerancia al estrés salino (Rathinasabapathi *et al.*, 1994; Guo *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1997a; Trossat *et al.*, 1997; Li *et al.*, 2000). Uno de los problemas de esta estrategia experimental es que el insuficiente suministro de colina endógena es un factor limitante en la acumulación de glicina betaína, como se ha encontrado en tabaco, *Arabidopsis thaliana* y *Brassica napus* (Nuccio *et al.*, 1998; Huang *et al.*, 2000). Además, a la fecha no se han reportado cultivos transgénicos tolerantes al estrés osmótico con la estabilidad genética necesaria, debido al silenciamiento de

genes y a la pérdida transgénica en la progenie de plantas transgénicas (Jia *et al.*, 2002). Otro problema, y no ciertamente menor, es que no se conocen a profundidad los mecanismos de regulación de la BADH cloroplástica, por lo que no está claro cómo podrá funcionar cuando se incorpore a plantas transgénicas en un ambiente metabólico diferente al que la enzima encuentra en las plantas que naturalmente la poseen. Por todo esto, mejorar la tolerancia de las plantas a la sequía y a las sales mediante ingeniería metabólica es aún un reto.

Es por tanto de sumo interés el profundizar en el conocimiento de la BADH mediante estudios funcionales y estructurales *in vitro* que permitan entender su regulación *in vivo*, y para ello es necesario contar con cantidades importantes de la enzima. En este trabajo nos propusimos obtener la enzima recombinante sobreexpresada en su forma nativa y en cantidades suficientes para permitir estos estudios.



Nascent/Ana Cázares

2. ANTECEDENTES

2.1. Las aldehído deshidrogenasas

Los aldehídos son compuestos abundantemente distribuidos en la naturaleza, y debido a su alta reactividad, se les encuentra generalmente como intermediarios en el metabolismo de otros compuestos. La mayoría de los aldehídos tiene efectos negativos, entre los cuales están citotoxicidad, mutagenicidad, genotoxicidad y carcinogenicidad (Lindhal, 1992). Por esto es importante que los aldehídos sean eliminados selectivamente en los sistemas biológicos para evitar sus efectos. Una de las maneras más efectivas de hacerlo es oxidándolos irreversiblemente hasta sus

Antecedentes

correspondientes ácidos carboxílicos, que son inocuos. Las aldehído deshidrogenasas (ALDHs, EC 1.2.1) son enzimas que catalizan esta oxidación irreversible con la reducción concomitante de NAD^+ o NADP^+ (Figura 1) y se encuentran en toda la escala filogenética.

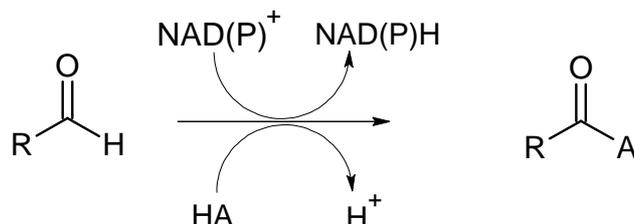


Figura 1. Reacción general catalizada por las aldehído deshidrogenasas.

Esta superfamilia comprende enzimas con una especificidad amplia, que pueden aceptar como sustratos una gran variedad de aldehídos alifáticos y aromáticos, así como aldehídos funcionalizados en la posición α al carbonilo (Figura 2).

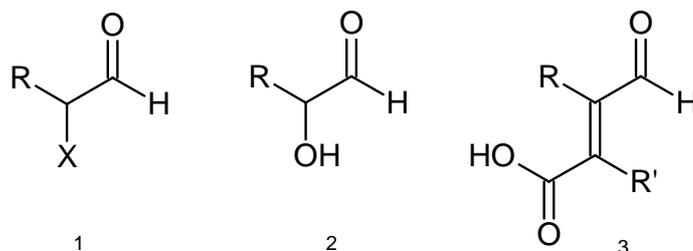


Figura 2. Estructura química de algunos de los aldehídos aceptados por las ALDHs. Aldehídos α -halogenados (1); aldehídos α -hidroxilados (2) y aldehídos α -enoicos (3).

Otras ALDHs, sin embargo, son más específicas y usan como sustratos sólo a un aldehído o a un grupo de aldehídos químicamente muy relacionados. Entre éstas se encuentran la semialdehído deshidrogenasa del succinato (Niegemann *et al.*, 1993), la semialdehído deshidrogenasa del glutamato (Krzywicki & Brandriss,

Antecedentes

1984) y la betaína aldehído deshidrogenasa (Nagasawa *et al.*, 1976; Weigel *et al.*, 1986; Weretilnyk & Hanson, 1989; Falkenberg & Strom, 1990; Valenzuela-Soto & Muñoz-Clares, 1993; Chern & Pietruszko, 1995; Vojtechová *et al.*, 1997a), entre otras.

Anteriormente, la clasificación de las ALDHs se realizaba con base en ciertos criterios, como la naturaleza de la molécula que genera el nucleófilo (HA en la Figura 1) o la localización celular de la enzima en el caso de las enzimas de mamíferos (Jacoby, 1963; Lindahl & Hempel, 1991). En el primer caso, la enzima era de clase I si HA es agua; de clase II si A⁻ es un fosfato, arsenato o tiolato; y de clase III cuando la hidrólisis se da por una combinación de las dos clases anteriores. Basándose en su localización celular, las ALDHs citosólicas son de clase I; las mitocondriales son de clase II; y las microsomales y tumorales son de clase III. Actualmente, sólo se considera que forman parte de la superfamilia de las ALDHs aquellas que en su mecanismo químico tienen un paso de hidrólisis del tioéster o la transferencia del ácido a la coenzima A (ALDHs no fosforilantes), que son las que están relacionadas estructuralmente. Éstas se agrupan en familias de acuerdo a sus relaciones filogenéticas (Vasiliou *et al.*, 1999; Aldehyde Dehydrogenase Gene Superfamily Database, <http://www.aldh.org/>).

La existencia de una ALDH en el hígado bovino se demostró por primera vez en 1949 (Racker, 1949), y 18 años después se purificó por primera vez una ALDH de levadura (Steinman & Jakoby, 1967). Finalmente en 1972 se logró purificar la ALDH de hígado de caballo, la primera de mamífero purificada (Feldman & Weiner, 1972), y hasta la fecha se han purificado muchas otras ALDHs.

En cuanto a secuencia de aminoácidos de una ALDH, la primera conocida fue la de hígado humano en 1984 (Hempel *et al.*, 1984), desde entonces se conoce la

Antecedentes

secuencia de aminoácidos de más de 700 ALDHs de arqueas, bacterias, protozoarios, hongos, plantas y animales que se encuentran en las bases de datos de NCBI y ExPASy. Entre los residuos estrictamente conservados en estas enzimas se encuentran los aminoácidos del sitio activo que se ha demostrado que son esenciales para la catálisis mediante experimentos de mutagénesis sitio-dirigida: una cisteína, un glutamato y una asparagina (Farrés *et al.*, 1995).

El mecanismo químico propuesto para la reacción catalizada por las ALDHs (Figura 3) consiste en la formación de un intermediario tiohemiacetal seguido de la transferencia del hidruro del carbono sp^2 del aldehído al nucleótido (NAD^+ o $NADP^+$).

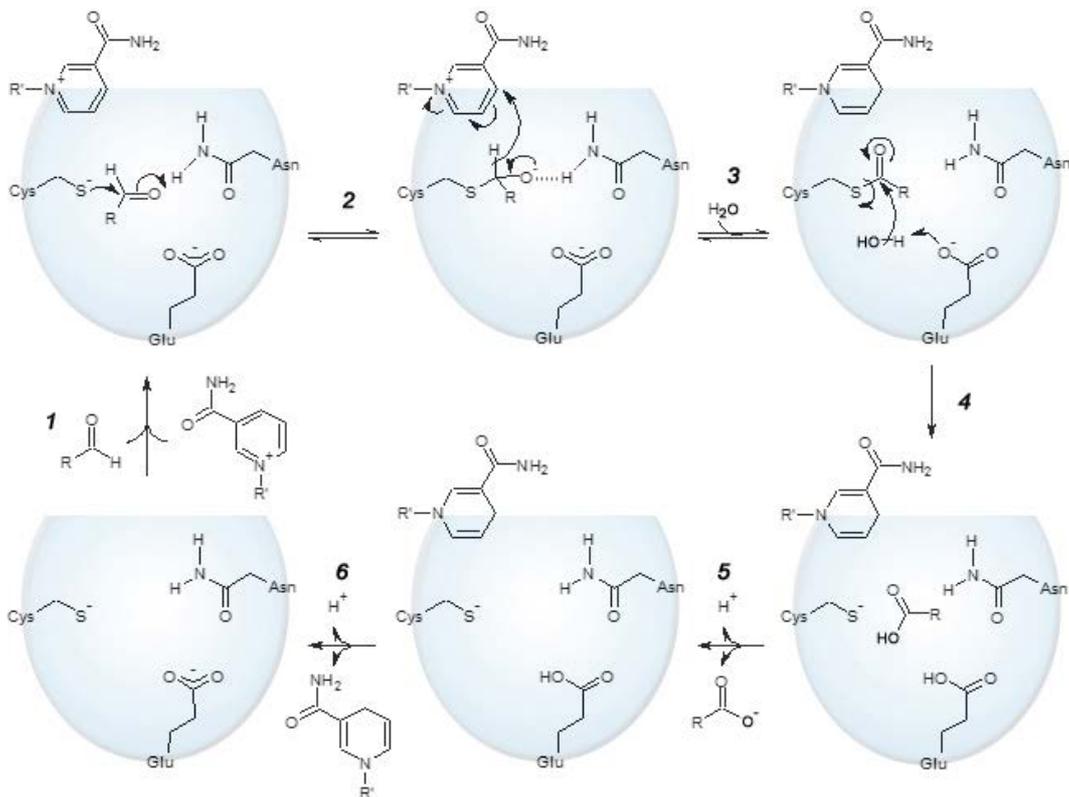


Figura 3. Esquema del mecanismo químico propuesto para la reacción catalizada por las ALDHs no fosforilantes.

Antecedentes

Ya que la sustracción de un ión hidruro a un aldehído no se da fácilmente, una vez que se han unido la coenzima y el sustrato al sitio activo de la enzima (paso 1), la cisteína catalítica reacciona con el carbonilo trigonal plano del aldehído para formar un tiohemiacetal tetraédrico (paso 2) con un carbono sp^3 , del cual es más fácil sustraer un ión hidruro. El tiohemiacetal desprotonado en el oxígeno es estabilizado por la asparagina catalítica en el hoyo del oxianión mediante un puente de hidrógeno. Cuando el par de electrones regresa al carbono para regenerar su hibridación sp^2 , se propicia la transferencia del hidruro al nucleótido para formar un tioéster (paso 3), que es hidrolizado por una molécula de agua activada por el glutamato catalítico (paso 4) (Weiner *et al.*, 1995). Una vez formado el ácido carboxílico correspondiente, se liberan los productos de la reacción para regenerar la enzima libre (pasos 5 y 6).

Por otra parte, se han determinado además las estructuras tridimensionales de algunas ALDHs (Steinmetz *et al.*, 1997; Moore *et al.*, 1998; Cobessi *et al.*, 1999; Lamb & Newcomer, 1999; Ahvazi *et al.*, 2000), las primeras de éstas fueron la ALDH2 de bovino que es una enzima tetramérica (Steinmetz *et al.*, 1997); la ALDH3 de rata que es un dímero (Liu *et al.*, 1997b) y la ALDH9 de bacalao, que es un tetrámero con actividad BADH (Johansson *et al.*, 1998).

2.1.1 Las betaína aldehído deshidrogenasas

Las betaína aldehído deshidrogenasas (BADHs, EC 1.2.1.8) pertenecen a la superfamilia de las ALDHs no fosforilantes y son enzimas que catalizan la oxidación irreversible de la betaína aldehído y otros aldehídos, como el 3-amino-propionaldehído, 3-dimetilsulfonio-propionaldehído, el 4-amino-butiraldehído y el

Antecedentes

4-*N*-trimetil-amino-butiraldehído, a sus correspondientes ácidos carboxílicos con la reducción simultánea de NAD⁺ o NADP⁺.

Las BADHs, a diferencia de las ALDHs, no están representadas a lo largo de toda la escala filogenética pues no están presentes en arqueobacterias, cianobacterias y en algunos hongos como *Saccharomyces* (Julián-Sánchez *et al.*, 2007). Los primeros estudios filogenéticos realizados de la superfamilia de las ALDHs (Rzhetsky *et al.*, 1997; Legaría *et al.*, 1998; Yoshida *et al.*, 1998; Incharoensakdi *et al.*, 2000; Hjelmqvist *et al.*, 2003) mostraron que la actividad BADH apareció probablemente en diferentes momentos en los diferentes grupos de organismos. Los resultados de estos estudios sugirieron que las BADHs de animales y plantas pertenecen a familias separadas (Perozich *et al.*, 1999; Vasiliou *et al.*, 1999; Incharoensakdi *et al.*, 2000), que fueron nombradas por el ALDH Gene Superfamily Database (AGNC) como ALDH9 y ALDH10 para BADHs de animales y plantas, respectivamente (Vasiliou *et al.*, 1999). Los resultados de un estudio filogenético más reciente y mucho más extenso confirmaron que existen tres grupos de BADHs que no están filogenéticamente más cercanos entre sí que con el resto de las familias de ALDHs (Figura 4) (Julián-Sánchez *et al.*, 2007). Los miembros en cada una de estas dos familias comparten el mismo estado de oligomerización, aquellas BADHs de la familia ALDH9 son tetraméricas, mientras que las de la familia ALDH10 son diméricas; aunque tienen localizaciones sub-celulares, especificidades a sustratos, funciones fisiológicas así como propiedades estructurales y cinéticas diferentes.

Antecedentes

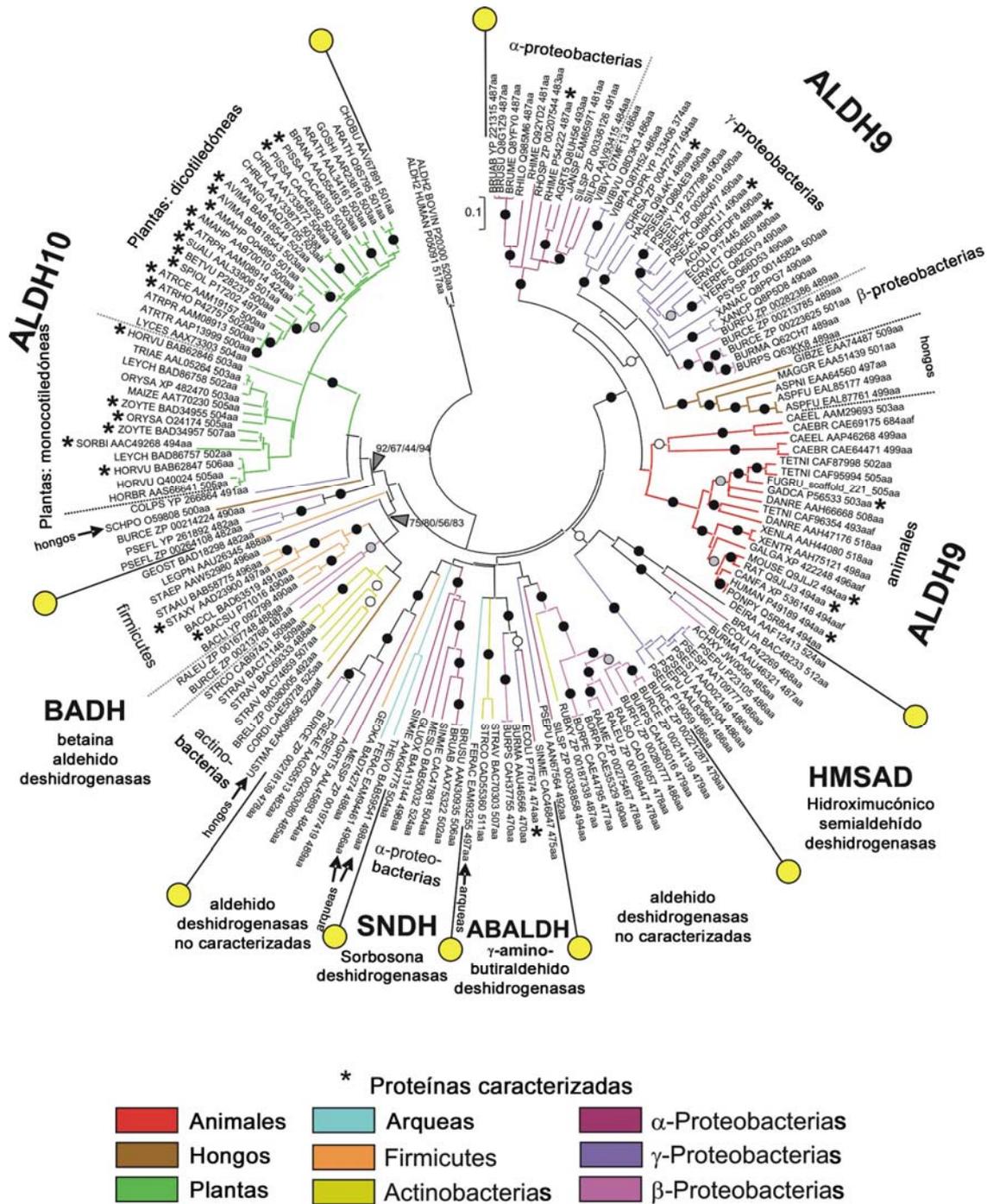


Figura 4. Relaciones filogenéticas de enzimas con actividad BADH y/o aminoaldehído deshidrogenasa (Julián-Sánchez *et al.*, 2007).

En animales, las BADHs se cree que están involucradas en el catabolismo de poliaminas (Ambroziak & Pietruszko, 1991; Pietruszko *et al.*, 1997), la síntesis del ácido γ -amino-butírico (GABA) (Lin *et al.*, 1996), la biosíntesis de carnitina (Vaz *et*

Antecedentes

al., 2000) y la biosíntesis de glicina betaína, que a su vez puede funcionar como donador de metilos en la biosíntesis de metionina (Du Vigneaud *et al.*, 1946; Muntz, 1950) o como osmoprotector en células de riñón (Petronini *et al.*, 1992; Grunewald & Eckstein, 1995). En plantas, se piensa que las BADHs están involucradas principalmente en la síntesis de los osmoprotectores glicina betaína (Weretilnyk & Hanson, 1989; Valenzuela-Soto & Muñoz-Clares, 1994; Hibino *et al.*, 2001; Nakamura *et al.*, 2001) o dimetilsulfonio-propionato (Jakoby & Fredericks, 1959; Trossat *et al.*, 1997; Vojtechová *et al.*, 1997a) y en el catabolismo de poliaminas (Jakoby & Fredericks, 1959; Trossat *et al.*, 1997; Vojtechová *et al.*, 1997a; Incharoensakdi *et al.*, 2000; Brauner *et al.*, 2003). En bacterias, se cree que las BADHs están implicadas en la síntesis de glicina betaína, como parte de la respuesta de estos organismos ante condiciones de estrés osmótico (Falkenberg & Strom, 1990; Boch *et al.*, 1996), o como parte del catabolismo de colina (Nagasawa *et al.*, 1976; Smith *et al.*, 1988; Meskys *et al.*, 2001; Velasco-García *et al.*, 2005) en aquellas bacterias capaces de crecer con colina como su única fuente de carbono, nitrógeno y energía (Korstee, 1970; Levering *et al.*, 1981).

La expresión de las BADHs en plantas aumenta en respuesta al estrés osmótico (déficit de agua, salinización, frío) o, en el caso de las enzimas bacterianas, a la presencia de colina en el medio de cultivo, lo cual ha permitido la extracción y purificación de las BADHs de varios organismos procarióticos y eucarióticos (Nagasawa *et al.*, 1976; Arakawa *et al.*, 1987; Kurys *et al.*, 1989; Falkeberg & Strom, 1990; Ambroziak & Pietruszko, 1991; Mori *et al.*, 1992; Valenzuela-Soto & Muñoz-Clares, 1994; Chern & Pietruszko, 1995; Boch *et al.*, 1997; Guzmán-Partida & Valenzuela-Soto, 1998; Velasco-García *et al.*, 1999; Mori *et al.*, 2002; Hjelmqvist *et al.*, 2003; Oishi & Ebina, 2005). También se ha logrado expresar la

Antecedentes

BADH de algunos organismos, como *Bacillus subtilis* (Boch *et al.*, 1997), espinaca (Incharoensakdi *et al.*, 2000), *Avicennia marina* (Hibino *et al.*, 2001) y *Pseudomonas aeruginosa* (Velasco-García *et al.*, 2005), en células de *Escherichia coli* transformadas con un vector de expresión conteniendo el gen de la BADH correspondiente.

Todas las BADHs estudiadas hasta la fecha han resultado ser enzimas solubles, no se ha reportado ninguna BADH membranal. En animales, la BADH de hígado de mamífero se encuentra principalmente en el citosol (Rothschild & Guzmán-Barrón, 1954; Hulse & Henderson, 1980; Ambroziak & Pietruszko, 1991; Vaz *et al.*, 2000), con una pequeña cantidad de BADH mitocondrial (Glenn & Vanko, 1959; Wilken *et al.*, 1970; Pietruszko & Chern, 2001); ambas BADHs parecen ser producto del mismo gen (Pietruszko & Chern, 2001). En las plantas productoras de glicina betaína, la actividad BADH se localiza principalmente en los cloroplastos de las hojas (Weigel *et al.*, 1986) con una pequeña porción de BADH citosólica (Weigel *et al.*, 1986). Aunque los genes que codifican para las BADHs vegetales son nucleares, las secuencias de las enzimas cloroplásticas no tienen los péptidos de tránsito típicos necesarios para entrar al cloroplasto (Rathinasabapathi *et al.*, 1994). En otras plantas la BADH se encuentra en el peroxisoma (Nakamura *et al.*, 1997).

A partir de las coordenadas cristalográficas de la BADH de hígado de bacalao (Johansson *et al.*, 1998) se pudieron obtener modelos tridimensionales del monómero, dímero y tetramero de la BADH de *P. aeruginosa* (Figura 5) (González-Segura *et al.*, 2005). La BADH de hígado de bacalao, al igual que el resto de las ALDHs cuya estructura se conoce, posee tres dominios distintos en cada sub-unidad: un dominio de unión a la coenzima que presenta una estructura α/β con

Antecedentes

un plegamiento tipo Rossman (Rossmann *et al.*, 1975); un dominio catalítico que une al aldehído y que muestra una semejanza estructural con el primer dominio; y finalmente un dominio de oligomerización que podría considerarse como una extensión del dominio de unión a la coenzima y que interviene en la formación del dímero.

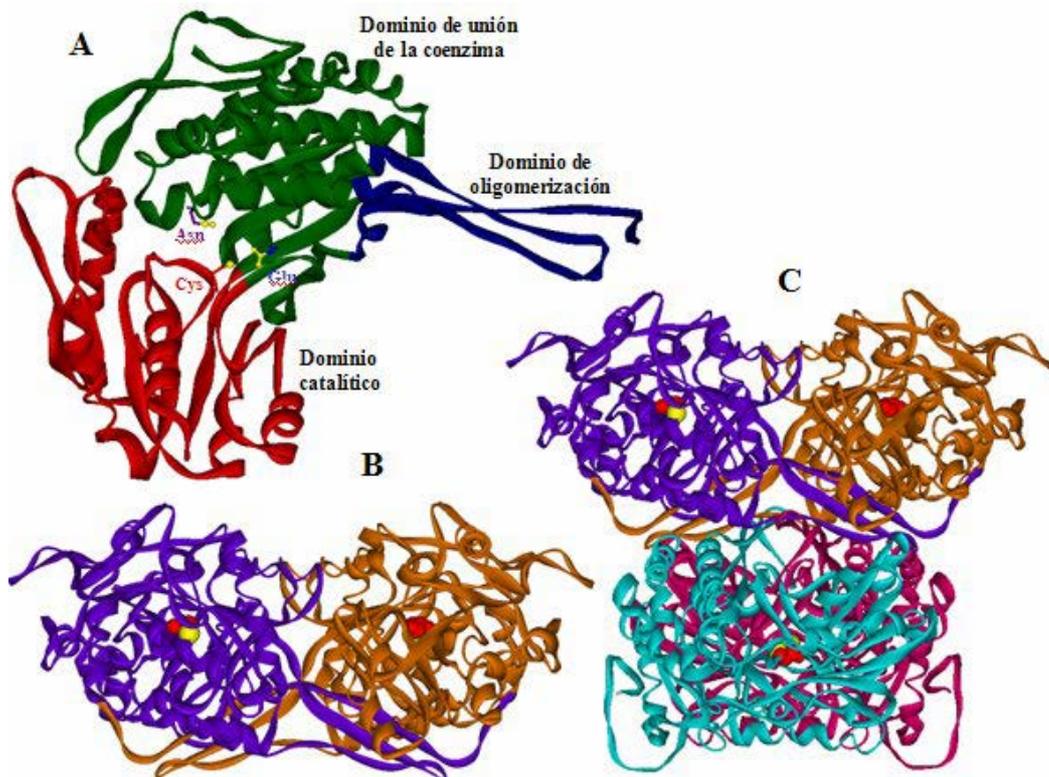


Figura 5. Modelo tridimensional de la BADH de *P. aeruginosa*. Monómero (A), dímero (B) y tetrámero (C) de la BADH de *P. aeruginosa* realizados a partir de la estructura de la ALDH9 de hígado de bacalao.

Aun cuando existen alrededor de 150 secuencias de BADHs en los bancos de información genómica, se ha determinado el mecanismo cinético de muy pocas: de las de *E. coli*, de hoja de amaranto, de riñón de cerdo y de *P. aeruginosa*. Para *E. coli* el mecanismo cinético es de tipo Ping Pong Bi Bi (Falkenberg & Strom, 1990). Para las BADHs de hoja de amaranto y de riñón de cerdo, se encontraron mecanismos Iso Bi Bi ordenados en estado estacionario (Valenzuela-Soto &

Antecedentes

Muñoz-Clares, 1993; Figueroa-Soto & Valenzuela-Soto, 2000), que en el caso de la enzima de amaranto se convierte en Bi Bi al azar en estado estacionario a altas concentraciones del aldehído (Vojtechová *et al.*, 1997a). Finalmente para la enzima de *P. aeruginosa* se encontró un mecanismo Bi Bi al azar en estado estacionario (Velasco-García *et al.*, 2000).

2.1.1.1. La betaína aldehído deshidrogenasa de hoja de amaranto

En nuestro laboratorio se está estudiando desde hace años la enzima **betaína aldehído deshidrogenasa de hoja de amaranto (AhyBADH)**. Esta enzima se purificó a partir de hojas de amaranto sometidas a déficit de agua (Valenzuela-Soto & Muñoz-Clares, 1994), pero a pesar de que el procedimiento de purificación tiene un alto rendimiento, la cantidad de proteína pura que se obtiene es muy poca debido a que la cantidad de proteína AhyBADH que produce la planta, aun cuando se induce su síntesis por estrés osmótico, es muy baja. Sin embargo, con esta proteína purificada a partir de las hojas se lograron hacer numerosos estudios que han permitido conocer algunas de las propiedades funcionales y estructurales de la AhyBADH (Valenzuela-Soto & Muñoz-Clares, 1993, 1994; Muñoz-Clares *et al.*, 1997; Vojtechová *et al.*, 1997a; Vojtechová *et al.*, 1997b; Vojtechová *et al.*, 1999; Muñoz-Clares & Mújica-Jiménez, 2001; Muñoz-Clares *et al.*, 2003; Velasco-García *et al.*, 2003).

Esta enzima pertenece a la familia ALDH10 y, en concreto, cataliza la oxidación irreversible de la betaína aldehído a glicina betaína con la reducción concomitante de NAD⁺ preferentemente, aunque también puede usar NADP⁺ (Figura 6).

Antecedentes

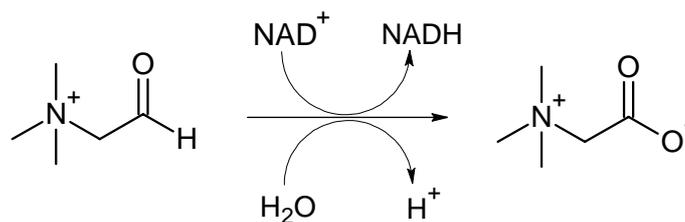


Figura 6. Reacción catalizada por la AhyBADH.

La AhyBADH es un homodímero (Valenzuela-Soto & Muñoz-Clares, 1994) (Figura 7) compuesto de dos subunidades derivadas de un mismo gen nuclear (Legaría *et al.*, 1998), al igual que las otras BADHs vegetales conocidas.

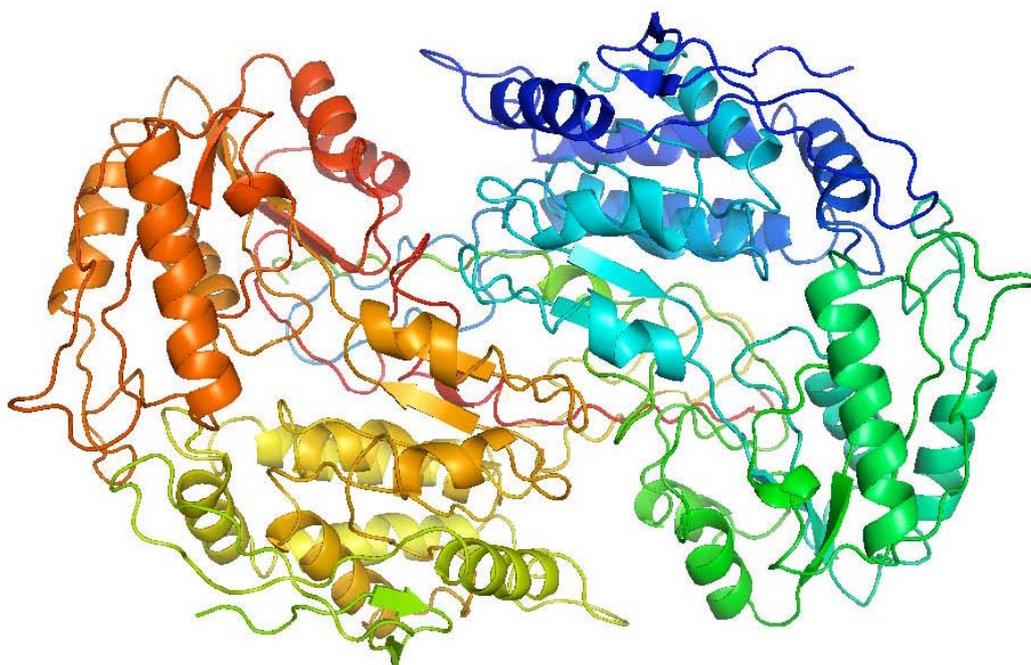


Figura 7. Modelo tridimensional de la AhyBADH. Modelo tridimensional que representa al homodímero de la AhyBADH obtenido a partir de las coordenadas cristalográficas de la ALDH9 de hígado de bacalao (Johansson *et al.*, 1998).

La longitud del polipéptido que constituye cada subunidad de la AhyBADH es de 501 aminoácidos, con una masa molar de 54.5 kDa. La AhyBADH consta de

Antecedentes

3 dominios al igual que el resto de las ALDHs y en el mecanismo químico participa una molécula de agua en la hidrólisis. Como mencioné anteriormente, el mecanismo cinético que exhibe la AhyBADH (Figura 8) es un mecanismo secuencial ordenado Iso Bi Bi en estado estacionario, en el cual el primer sustrato en unirse a la enzima es el nucleótido oxidado y el último producto en liberarse es el nucleótido reducido (Valenzuela-Soto & Muñoz-Clares, 1993). En este tipo de mecanismos (Cleland, 1963) existe un paso de isomerización de la enzima libre, de tal suerte que el nucleótido en cada estado de oxidación se une a formas diferentes de la enzima (Figura 8).

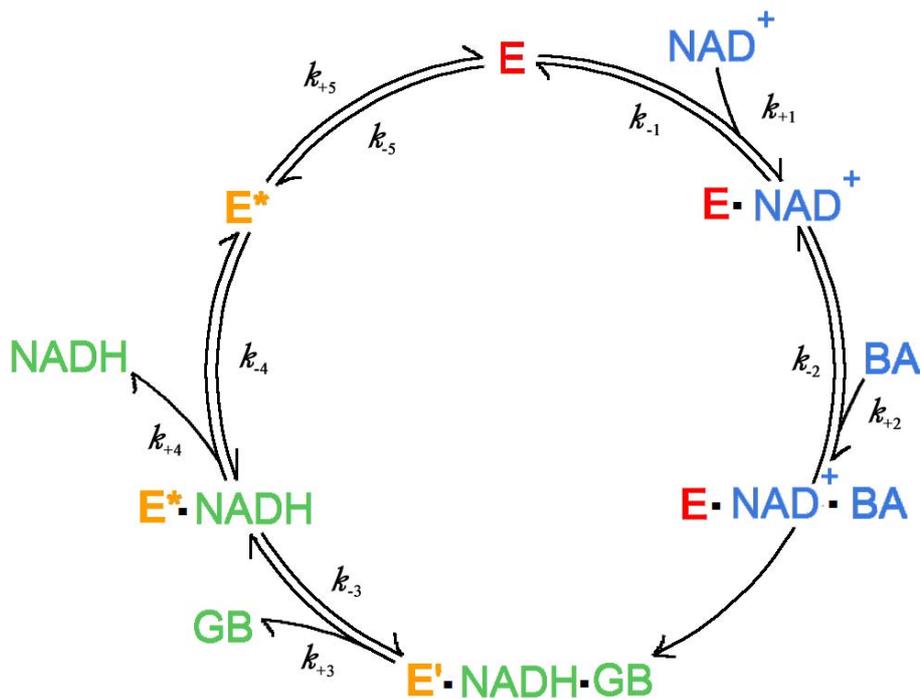


Figura 8. Esquema del mecanismo cinético de la AhyBADH.

Por otro lado, se conocen varios aspectos de su regulación a corto plazo como el hecho de que aun a concentraciones de 100 mM, la glicina betaína no inhibe la actividad de la AhyBADH, como era de esperarse dado que todas las

Antecedentes

ALDHs que han sido caracterizadas bioquímicamente no son inhibidas por el ácido producto de las reacciones que catalizan debido a su poca afinidad por éste. En el caso de la BADH de cloroplasto, ésta es una característica importante que le permite a la planta acumular grandes cantidades de glicina betaína para cumplir con su función como osmoprotector. Sin embargo, la AhyBADH es inhibida por su otro producto: el NADH, que es un inhibidor mixto con respecto a NAD^+ , lo cual hace a la AhyBADH diferente a la mayoría de las deshidrogenasas conocidas, que exhiben una inhibición competitiva del nucleótido reducido (NADH) con respecto al nucleótido oxidado (NAD^+). El componente incompetitivo de esta inhibición indica que puede ocurrir incluso a concentraciones altas de NAD^+ , lo que hace a la actividad de la AhyBADH muy sensible a la razón NAD^+/NADH intracloroplástica.

En 1998 se reportaron las secuencias de dos genes que codifican para la AhyBADH, *ahybadh4* y *ahybadh17* (Legaría *et al.*, 1998). Se realizó un alineamiento de las secuencias aminoacídicas de estos dos genes, que poseen un 98% de identidad a nivel de secuencia de aminoácidos (Figura 9) y también un alto grado de identidad con las otras secuencias de BADHs de plantas reportadas (no mostrado).

Antecedentes

AHYBADH4	1	MAIRVPSRQLFIDGEWREPIKKNRIPIN NP STEEIIGDIPAATAEDVELAVAAAR
AHYBADH17,	1	MAIRVPSRQLFIDGEWREPIKKNRIPIN NP STEEIIGVIPAATAEDVELAVAAAR

AHYBADH4	61	NKGEDWASASGAHRAKYLRAIAAKITEKKDYFAKLEAMDCGKPLDEAARDIDDVA
AHYBADH17,	61	NKGEDWASASGAHRAKYLRAIAAKITEKKDYFAKLEAMDCGKPLDEAARDIDDVA

AHYBADH4	121	YADQAEALDAKQKAPIALPMDTFKCHVLKQPIGVVGLISPWNYPLLMATWKVAPA
AHYBADH17,	121	YADQAEALDAKQKAPIALPMDTFKCHVLKQPIGVVGLISPWNYPLLMATWKVAPA

AHYBADH4	181	SAVLKPSELASVTCLELAEVCREVGLPPGVLNILTGLGPEAGGPLACHPDVDKVA
AHYBADH17,	181	SAVLKPSELASVTCLELAEVCREVGLPPGVLNILTGLGPEAGGPLACHPDVDKVA

AHYBADH4	241	ATGSKVMSSAAQLVKPVTLELGGKSPIVIFEDVDLDKAAEWTAFGCFWTNGQICS
AHYBADH17,	241	ATGSKVMSSAAQLVKPVTLELGGKSPIVIFEDVDLDKAAEWTAFGCFWTNGQICS

AHYBADH4	301	LVHESIAAEFLDRLVKWCKNIKISDPFEEGCRLGPVVSQYKVLKFI STAKSE
AHYBADH17,	301	LVHESIAAEFLDRLVKWCKNIKISDPFEEGCRLGPVVSQYKVLKFI STAKSE

AHYBADH4	361	CGGSRPEHLKKGYYVEPTIISDVSTSMQIWREEVFGPVL CQKTFGSEDEAIELAN
AHYBADH17,	361	CGGSRPEHLKKGYYVEPTIISDVSTSMQIWREEVFGPVL CVKTFGSEDEAIELAN

AHYBADH4	421	LGAAVLSKDLDR CERITKALEV GAVV WNC SQPCFTQAPWGGTKRSGFGRELGEW
AHYBADH17,	421	LGAAVLSKDLDR CERITKALQAGI VV WNC SQPCFCQAPWGGTKRSGFGRELGEW
		***** * *****
AHYBADH4	481	NIKQVTRDTSTDEPWGWYKSP
AHYBADH17,	481	NIKQVTEYIS-DEPWGWYKSP
		***** * *****

Figura 9. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos codificadas por los genes *ahybadh4* y *ahybadh17*. Con un asterisco se marcan los residuos de aminoácidos presentes en ambas isoenzimas.

Además se tiene el gen *ahybadh17* clonado en el vector de expresión pBKS (pBKS-*ahybadh*), así como células de *E. coli* transformadas con este vector, pero hasta la fecha no se ha logrado obtener la proteína recombinante sobreexpresada en un sistema adecuado de expresión procariótico, como lo son células de *E. coli*, o eucariótico como células de *Saccharomyces cerevisiae*.

El contar con la enzima recombinante sobreexpresada permitiría obtener una cantidad mayor de proteína pura comparada con la obtenida por purificación directa de las hojas debido a que, como se mencionó, esta enzima no es muy abundante aun cuando se induzca su síntesis. Una mayor cantidad de la enzima permitiría avanzar

Antecedentes

mucho más rápidamente en su caracterización estructural y funcional. Además se podrían abordar experimentos que son irrealizables de momento debido a la alta cantidad de enzima requerida, como por ejemplo los estudios de cinética rápida para elucidar la velocidad de los diferentes pasos que componen la reacción catalizada y cómo estos se afectan cuando la enzima se inactiva por incubación con su sustrato, la betaína aldehído, o su producto, el NADH (Mújica-Jiménez & Muñoz-Clares, resultados no publicados). También se podría pensar en la cristalización y determinación de la estructura tridimensional de la enzima por difracción con rayos-X, lo que arrojaría mucha luz sobre como trabajan las enzimas diméricas de plantas. Por otro lado, se obtendría la enzima bajo condiciones no estresantes, lo cual sería muy importante para establecer si las condiciones de estrés osmótico, a las que se someten las plantas para la inducción de la enzima antes de su purificación, provocan algún cambio post-traducciona l en la proteína que modifique su función y/o regulación. Finalmente, una vez que se cuente con la proteína silvestre recombinante, se podrá realizar mutagénesis sitio-dirigida para explorar el papel de ciertos aminoácidos en la unión del sustrato y la coenzima, catálisis, regulación y estabilidad de la enzima.

2.2. Ingeniería genética

Antecedentes

Para entender mejor todo lo que se realizó durante el trabajo experimental, incluyo a continuación una revisión de los conceptos y temas más importantes de ingeniería genética, directamente relacionados con el tema de esta tesis (Voet & Voet, 1995; Stryer *et al.*, 2002).

2.2.1 Clonación molecular

Un gran problema en casi todas las áreas de investigación en bioquímica es obtener cantidades suficientes de la sustancia de interés, principalmente proteínas o ácidos nucleicos. En realidad, es raro recuperar una cantidad importante, al menos del 50%, de cualquier proteína originalmente presente en un organismo debido a la baja cantidad producida y a la gran cantidad de otras proteínas contaminantes. Las proteínas eucarióticas pueden ser aun más difíciles de obtener que las procarióticas y esto se debe a que muchos tejidos eucarióticos sólo están disponibles en pequeñas cantidades, lo cual hace necesario partir de una gran cantidad del tejido para obtener cantidades de proteína con las que se pueda trabajar. Afortunadamente a partir de los años 70s se han eliminado estas dificultades en su mayoría gracias al desarrollo de técnicas de **clonación molecular**, englobadas dentro de la tecnología de ingeniería genética o del DNA recombinante.

La idea principal de la clonación molecular es insertar un segmento de DNA de interés en una molécula de DNA que se replique autónomamente, los llamados **vectores de clonación** o vehículos, de tal suerte que el inserto de DNA se replique con el vector. La inserción de un vector quimérico de ese tipo en un organismo hospedero adecuado como células de *E. coli* o de levadura, resulta en la producción

Antecedentes

de grandes cantidades del segmento de DNA insertado. Si el gen clonado además está flanqueado por las secuencias de control para las síntesis de RNA y de proteínas, posicionadas adecuadamente, el hospedero también puede producir grandes cantidades del RNA y de las proteínas especificadas por ese gen.

2.2.1.1. Vectores de clonación

Los principales vectores de clonación usados en ingeniería genética son los plásmidos, bacteriófagos y los cromosomas artificiales de levadura (YACs).

Los **plásmidos** son cadenas dobles de DNA de 1 a 200 kb que contienen la maquinaria genética necesaria (*e.g.* un origen de replicación) para permitir su propagación autónoma en un hospedero bacteriano o en levaduras. Los plásmidos pueden ser considerados como parásitos moleculares, pero en muchos casos crean una simbiosis con el hospedero pues le confieren ciertas funciones de las que carece, como por ejemplo resistencia a antibióticos o la capacidad de sintetizar un aminoácido determinado.

Algunos tipos de plásmidos, presentes en una o unas cuantas copias por célula, se replican una vez por división celular como lo hace el cromosoma bacteriano; su replicación se dice que está bajo **control riguroso**. Por otro lado, existen plásmidos que se encuentran normalmente presentes de 10 hasta 700 copias por célula y se dice que están bajo **control relajado**; son estos últimos los plásmidos usados para clonación molecular. Estos plásmidos pueden continuar replicándose aun cuando la síntesis de proteínas del hospedero se inhiba, llegando a alcanzar las dos o tres mil copias por célula.

Antecedentes

Mediante técnicas de ingeniería genética se han construido plásmidos para su uso específico en clonación molecular. Éstos son relativamente pequeños, se replican bajo control relajado, portan genes que especifican resistencia a uno o más antibióticos y contienen varios sitios convenientemente localizados para endonucleasas de restricción, donde puede insertarse el DNA que se desea clonar. De hecho, muchos vectores plasmídicos contienen un segmento corto de DNA (de menos de 100 bp) que está estratégicamente posicionado y que se ha sintetizado de tal manera que contiene una gran variedad de sitios de restricción que no están presentes en ningún otro lugar en el plásmido. Este segmento es denominado **sitio de clonación múltiple**, aunque también se le conoce como “polylinker”, pues permite usar una amplia variedad de enzimas de restricción para enlazar el segmento de DNA de interés.

La bacteria hospedera acepta un plásmido cuando ambos son mezclados, en un proceso facilitado en gran medida por la presencia de iones divalentes como Ca^{2+} que incrementan la permeabilidad de la membrana al DNA. Al proceso mediante el cual un vector plasmídico absorbido se establece permanentemente en su hospedero bacteriano se le denomina **transformación**, y normalmente tiene una eficiencia de ~0.1%.

Estos vectores plasmídicos no pueden usarse para clonar DNAs de más de 10 kb, debido a que el tiempo que se requiere para la replicación del plásmido se incrementa con el tamaño del mismo. Los plásmidos intactos con insertos de gran tamaño no esenciales para el hospedero se pierden debido a la proliferación más rápida de plásmidos que han eliminado estos insertos por supresiones al azar.

El **bacteriófago λ** es un vehículo de clonación alternativo que puede usarse para clonar segmentos de DNA de hasta 16 kb. El bacteriófago filamentoso M13

Antecedentes

también es un vector de clonación útil que soporta insertos de DNA de menos de 1 kb pero que se usa principalmente para secuenciaciones del DNA.

Finalmente, los **YACs** pueden contener segmentos de DNA más grandes que los otros vectores (segmentos de hasta varios cientos de kb). Los YACs son segmentos lineales de DNA que contienen toda la parafernalia molecular que se requiere para su replicación en levadura.

2.2.1.2. Ensamble de genes

Generalmente, un segmento de DNA que va a ser clonado se obtiene como un fragmento definido usando endonucleasas de restricción específicas. Éstas son enzimas que cortan la cadena doble de DNA en sitios palindrómicos específicos para producir extremos de cadena sencilla que sean complementarios entre sí. Si se corta un vector de clonación con la misma enzima de restricción, los extremos del vector y del segmento de DNA que se va a clonar en este vector serán complementarios y podrán asociarse específicamente bajo condiciones anilladoras y unirse covalentemente mediante la DNA ligasa. Una gran ventaja de usar una enzima de restricción para construir un vector quimérico es que el inserto de DNA puede ser extraído del vector clonado cortándolo con la misma enzima de restricción.

2.2.1.2.1. Reacción en cadena de la polimerasa

Aun cuando pueda obtenerse un fragmento de DNA por medio de enzimas de restricción, frecuentemente el DNA obtenido es muy poco, por lo que

Antecedentes

debe usarse la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar un segmento específico de DNA de hasta 6 kb en forma rápida y conveniente. En esta técnica (Figura 10), una muestra de DNA desnaturalizado se incuba con DNA polimerasa, dNTPs y dos oligonucleótidos iniciadores cuyas secuencias flanqueen el segmento de DNA de interés para que dirijan la síntesis de nuevas hebras complementarias catalizada por la DNA polimerasa. Múltiples ciclos de este proceso, cada uno duplicando la cantidad de DNA presente, amplifican el DNA exponencialmente empezando desde tan poco como una sola copia del gen. En cada ciclo, las dos hebras del DNA de cadena doble se separan por desnaturalización térmica, los iniciadores se anillan a sus segmentos complementarios en el DNA y la DNA polimerasa realiza la síntesis de hebras complementarias. El uso de una DNA polimerasa estable al calor, como la polimerasa de *Taq*, elimina la necesidad de agregar enzima fresca después de cada paso de desnaturalización. Por lo tanto, en presencia de cantidades suficientes de iniciadores y dNTPs, la PCR se lleva a cabo simplemente por variación cíclica de la temperatura.

Veinte ciclos de amplificación por PCR incrementan la cantidad de la secuencia de DNA objetivo alrededor de un millón de veces con una alta especificidad. Por lo tanto, la amplificación por PCR es una forma automatizada de clonación molecular que no requiere células y que logra mediante reacciones *in vitro* de 3 a 4 horas producir una cantidad de DNA que de otra manera tomaría días o semanas.

Antecedentes

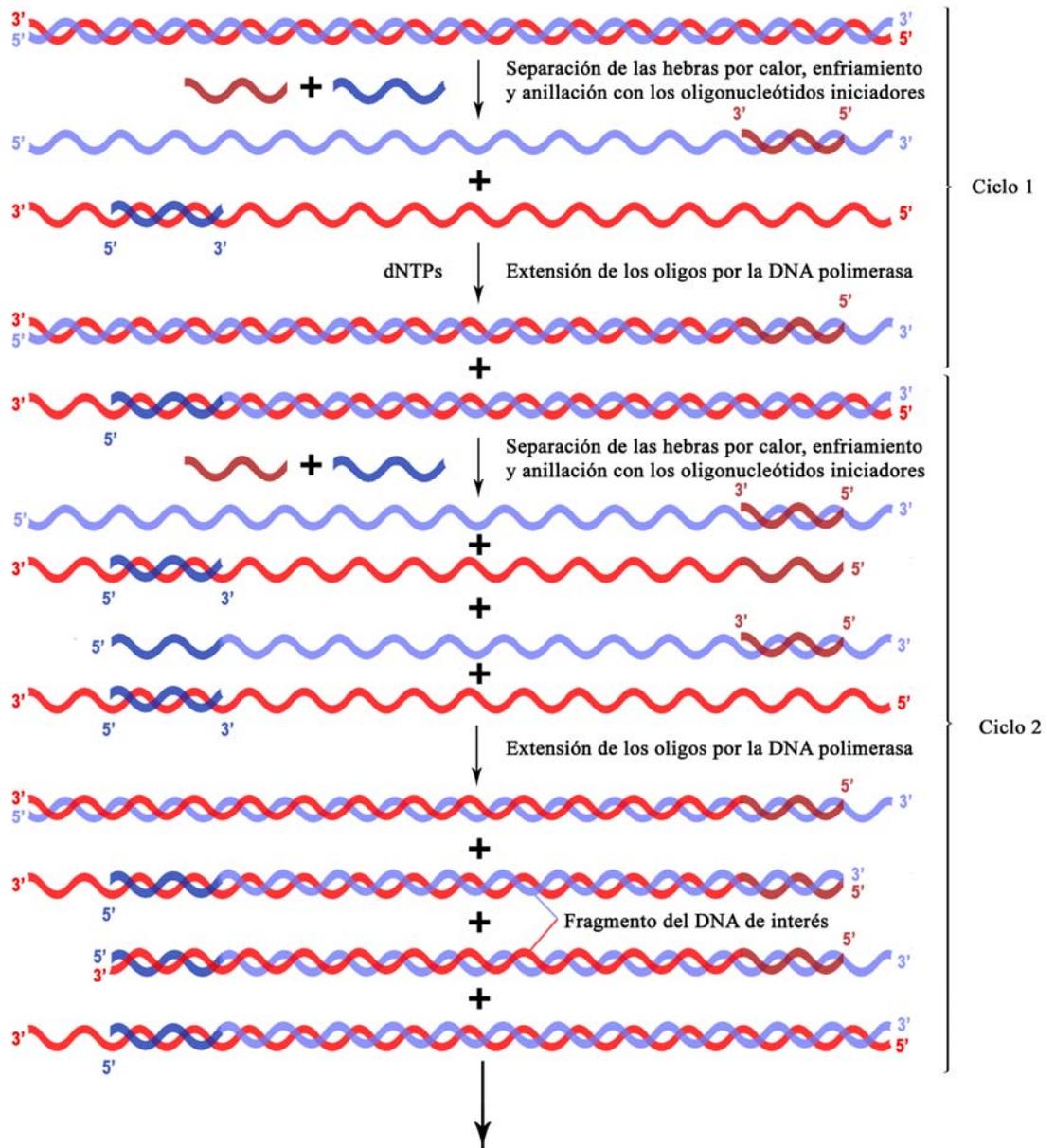


Figura 10. Esquema de la reacción en cadena de la polimerasa.

2.2.1.3. Selección de células transformadas

La selección de aquellos organismos hospederos que contienen un vector construido apropiadamente, en el caso de la transformación plasmídica, se hace mediante el uso de antibióticos y/o sustratos cromogénicos.

Antecedentes

Un ejemplo de cómo se hace esta selección es el de células de *E. coli* transformadas con el plásmido pUC18 que contiene un inserto de DNA foráneo en su región del polylinker. Éstas carecen de actividad β -galactosidasa porque el inserto interrumpe la secuencia que codifica para la proteína del gen *lacZ*. De esta manera, cuando se crecen células de este tipo en presencia de X-gal, una sustancia incolora que cuando es hidrolizada por la β -galactosidasa se oxida y genera un producto azul (Figura 11), las colonias bacterianas que tienen un inserto en su región del polylinker forman colonias incoloras, mientras que las bacterias que contienen sólo plásmidos sin el inserto forman colonias azules.

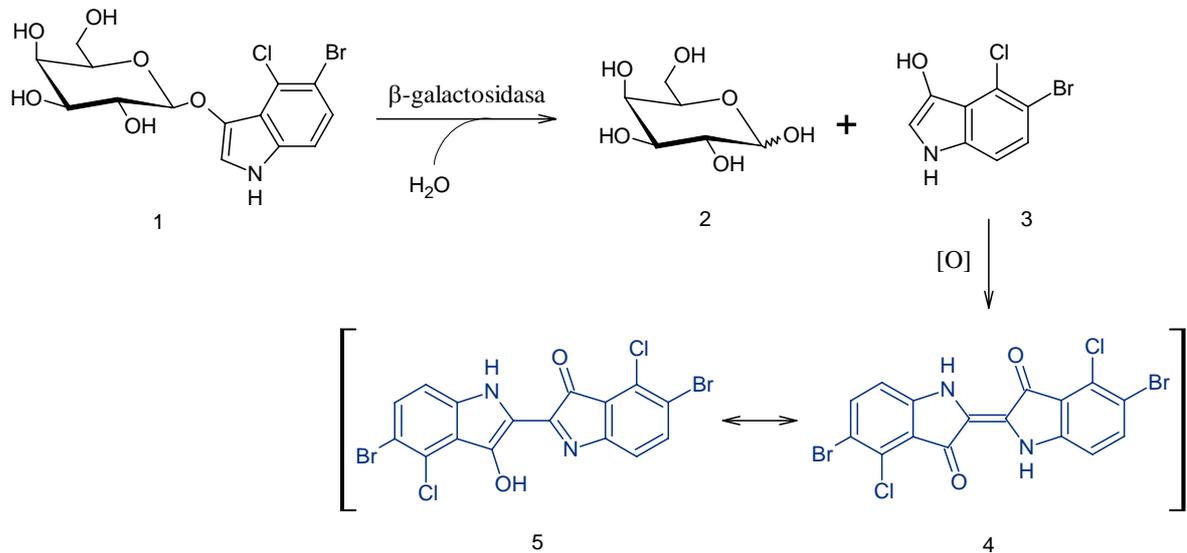


Figura 11. Reacción de la β -galactosidasa con X-gal. El X-gal (1) es hidrolizado por la β -galactosidasa para producir D-lactosa (2) y 5-bromo-4-cloro-1H-indol-3-ol (3), el cual se oxida espontáneamente a (4) y (5) que son de coloración azul.

Las bacterias que no fueron transformadas con el plásmido, que formarían también colonias incoloras en presencia de X-gal, pueden ser excluidas añadiendo un antibiótico al medio de crecimiento. Aquellas bacterias que no contienen el plásmido son sensibles a la ampicilina, mientras que las que lo contienen no lo son, debido a que el gen *amp*^R está intacto en el plásmido y éste le confiere a la bacteria

Antecedentes

resistencia a ampicilina. Es por esto que los genes de este tipo se conocen como **marcadores seleccionables**.

Estos genes marcadores seleccionables son importantes para la producción de organismos nuevos o novedosos, pues son herramientas que ayudan a identificar aquellas células que han incorporado exitosamente los genes para una característica deseada durante la transformación. Existen cuatro categorías de genes marcadores seleccionables: resistentes a antibióticos, auxotróficos o metabólicos, tolerantes a herbicidas y monitoreables.

Los genes marcadores **resistentes a antibióticos** como *amp^R*, confieren resistencia a un antibiótico específico. Son útiles en el desarrollo temprano de células transgénicas y se diseñan para expresarse a niveles mínimos y a menudo indetectables en el producto final. Los genes marcadores **auxotróficos** permiten a las células transformadas sintetizar un componente esencial, normalmente un aminoácido, que las células no producen de otra manera. El medio de crecimiento se hace intencionalmente carente del componente esencial que la célula requiere para crecer, y por lo tanto sólo las células que han incorporado exitosamente al marcador seleccionable junto con el resto de la construcción del gen producirán los componentes esenciales y sobrevivirán. Los genes marcadores **tolerantes a herbicidas** confieren la capacidad de tolerar la aplicación de un herbicida específico. Finalmente, los genes marcadores **monitoreables** son aquellos que codifican para una proteína que puede identificarse a través de varios análisis de laboratorio. La presencia de la proteína confirma que la transformación se ha llevado a cabo. Estos últimos no se usan comúnmente debido a que el procedimiento consume mucho tiempo, necesita equipo y reactivos específicos para realizar las pruebas y porque

Antecedentes

además el producto final del tejido debe ser destruido para determinar si la transformación se llevó a cabo.

2.2.2. Producción de proteínas recombinantes

Uno de los usos principales de la tecnología del DNA recombinante es en la producción de grandes cantidades de proteínas que o bien son escasas en las células que las producen o son novedosas. En el caso de proteínas bacterianas, este procedimiento es relativamente sencillo. Se debe insertar un gen estructural clonado en un vector de expresión, es decir, un plásmido que contenga las secuencias de control transcripcional y traduccional en la posición adecuada para la expresión de la proteína. Usando un plásmido de control relajado y un promotor eficiente, los niveles de la producción de una proteína de interés pueden alcanzar hasta 30% de la proteína celular total del hospedero. Los organismos transformados con un plásmido de este tipo que producen la proteína de interés son llamados **sobreproductores**.

La síntesis de proteínas eucarióticas en un hospedero procariótico presenta varios problemas que no se encuentran al expresar proteínas procarióticas. Uno de éstos es que los elementos eucarióticos de control para la síntesis de RNA y de proteínas no son reconocidos por hospederos bacterianos. Además, muchos genes eucarióticos contienen una o más secuencias internas no expresadas denominadas **intrones**, que en las células eucarióticas son eliminados del transcrito de RNA del gen para formar el mRNA maduro, pero que no pueden serlo en las bacterias, que no poseen la maquinaria necesaria ya que los genes bacterianos carecen de intrones. Por otro lado, las bacterias carecen de sistemas de enzimas para realizar el

Antecedentes

procesamiento post-traducciona l específico que muchas proteínas eucarióticas requieren para su actividad biológica. Un ejemplo es que no todas las bacterias glicosilan proteínas. Por último, las proteínas eucarióticas extrañas expresadas en la bacteria constituyen el objetivo preferente de las **proteasas** bacterianas.

Varios de estos problemas se han eliminado clonando el gen eucariótico que codifica para una proteína dada en un vector que contenga los elementos bacterianos de control y clonando el cDNA del mRNA de la proteína, o bien, para proteínas pequeñas de secuencia conocida, sintetizándolo químicamente de manera que no contenga intrones. La proteólisis bacteriana preferente se ha evitado mediante la inserción del gen eucariótico en un gen bacteriano, de modo que la proteína híbrida resultante tiene un polipéptido *N*-terminal de origen bacteriano que, en algunos casos, evita que las proteasas bacterianas reconozcan el segmento eucariótico como foráneo. El desarrollo de vectores de clonación para hospederos eucarióticos como levadura o células animales cultivadas ha ayudado a eliminar muchos de estos problemas, aunque el procesado post-traducciona l puede variar entre diferentes eucariontes. Aun así, ninguna de estas estrategias es universalmente aplicable y la expresión de una proteína sigue siendo en la mayoría de los casos un proceso de prueba y error.

La capacidad que poseemos hoy en día para producir una proteína dada en grandes cantidades está teniendo un enorme impacto en agricultura, medicina e industria. Entre las proteínas de uso médico más importantes que se están obteniendo con esta nueva metodología están la insulina humana, la hormona humana del crecimiento y la eritropoyetina.

Antecedentes

2.2.2.1. Inducción de la síntesis de proteínas

En términos de su síntesis existen dos tipos de proteínas, las constitutivas y las inducibles. Las **proteínas constitutivas** son sintetizadas a una velocidad relativamente constante y se encargan de realizar funciones celulares esenciales, llamadas coloquialmente de “house-keeping” o del “cuidado del hogar”, como por ejemplo el transporte a través de las membranas. Las **proteínas inducibles** en cambio, son sintetizadas en respuesta a una variación en el ambiente intra o extracelular y ayudan a la célula a adaptarse a este cambio.

Las células se adaptan a su medio produciendo enzimas que metabolizan ciertos nutrientes cuando éstos están disponibles. Un ejemplo son células de *E. coli* que cuando son crecidas en ausencia de lactosa, un disacárido formado por galactosa y glucosa en un enlace β -1,4, son incapaces de metabolizarla inmediatamente después de que se añada a su medio de cultivo. Para poder metabolizar este azúcar, se requiere β -galactosidasa para hidrolizar la lactosa (Figura 12) y galactósido permeasa ó lactosa permeasa para el transporte de la lactosa hacia la célula.

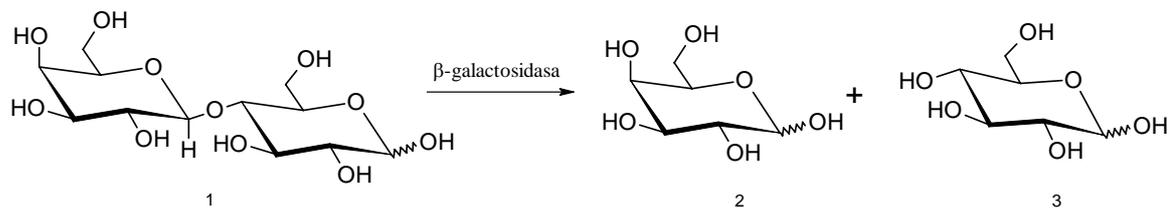


Figura 12. Hidrólisis de la lactosa. La β -galactosidasa cataliza la hidrólisis de la lactosa (1) a los monosacáridos correspondientes, D-galactosa (2) y D-glucosa (3).

Las células de *E. coli* en condiciones sin lactosa contienen sólo unas cuantas moléculas de estas proteínas; sin embargo, después de unos minutos de introducir

Antecedentes

lactosa en el medio, la célula acelera la velocidad de síntesis de estas proteínas hasta 1000 veces y la mantiene hasta que ya no hay lactosa, que es cuando la velocidad de síntesis regresa a su minúsculo nivel original. Por lo tanto, la lactosa o uno de sus productos metabólicos debe activar la síntesis de estas proteínas de alguna manera.

La regulación paralela de la β -galactosidasa y la permeasa sugirió que la expresión de los genes que codifican para estas enzimas se controla por un mecanismo común. François Jacob y Jacques Monod propusieron el **modelo del operón** para explicar esta regulación paralela así como los resultados de otros experimentos (Jacob & Monod, 1961). Los elementos genéticos del modelo son un **gen regulador**, una secuencia reguladora de DNA denominada sitio **operador** y un conjunto de **genes estructurales**.

El gen regulador codifica para el **repressor**, que es una proteína que se une al sitio operador del DNA, lo cual evita la transcripción de genes estructurales. El operador y sus genes estructurales asociados constituyen al **operón**. Para el operón de la lactosa (Figura 13), el gen *lacI* codifica para el repressor y los genes *lacZ*, *lacY* y *lacA* son los genes estructurales para β -galactosidasa, la permeasa y la transacetilasa, respectivamente. El operón también contiene un sitio **promotor**, que dirige a la RNA polimerasa hacia el sitio correcto de inicio de la transcripción. Los genes *lacZ*, *lacY* y *lacA* se transcriben para dar una sola molécula de mRNA que codifica para las tres proteínas. Cuando una molécula de mRNA codifica para más de una proteína se dice que la transcripción es **poligénica** o **policistronica**.

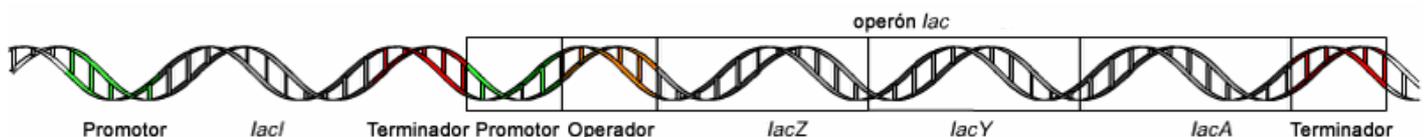


Figura 13. Operón lac. Esquematación del operón *lac* con sus componentes.

Antecedentes

El represor *lac* es una proteína que puede existir como un dímero de sub-unidades de 37 kDa o como un dímero de dímeros. En ausencia de lactosa, el represor se une muy estrecha y rápidamente al sitio operador, evitando así que la RNA polimerasa desenrolle el DNA para exponer las bases que actuarán como plantilla para la síntesis de la hebra de RNA. El represor *lac* se une específicamente al DNA del operador, en una unión alrededor de 4×10^6 veces más fuerte que a otros sitios en el genoma a los que podría unirse no específicamente. Este alto grado de selectividad permite al represor encontrar el operador eficientemente aun con el gran exceso de otros sitios en el genoma de *E. coli*.

La presencia de lactosa, como ya se mencionó anteriormente, provoca la expresión del operón *lac*, pero interesantemente no es la lactosa la que tiene este efecto, sino la **alolactosa** (Figura 14) que es un análogo de la lactosa que se produce de manera secundaria en la reacción catalizada por la poca β -galactosidasa presente al inicio. Debido a esta capacidad de inducir la expresión del operón *lac*, a la alolactosa se le llama **inductor** del operón *lac*. Además de la alolactosa que es el inductor fisiológico del sistema de la lactosa, existen otros β -galactósidos como el **β -D-isopropiltiogalactósido (IPTG)** (Figura 14) que son inductores potentes de la expresión del operón *lac* aun cuando no sean sustratos de la enzima, lo cual es de gran utilidad pues una baja cantidad del inductor puede inducir la síntesis de las proteínas sin la necesidad de agregar inductor fresco cada vez que éste se agote como sería en el caso de la alolactosa, que es hidrolizada por la β -galactosidasa a galactosa y glucosa.

Antecedentes

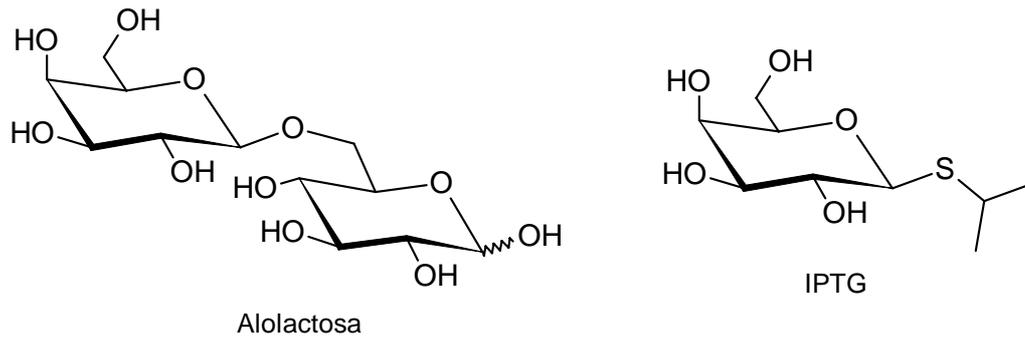


Figura 14. Estructura de dos de los inductores del operón *lac*.

La modulación de la expresión génica por la presencia del inductor ocurre cuando el inductor se une al represor, provocando que la afinidad de éste para el DNA se reduzca mucho. Una molécula del inductor se une a cada monómero del represor, causando cambios conformacionales locales que se transmiten a los dominios de unión al DNA. La relación entre los dominios de unión al DNA se modifica de forma que no pueden interactuar con el DNA fácilmente de manera simultánea, lo que lleva a una reducción dramática en la afinidad de unión al DNA. Por lo tanto, cuando el inductor se une al represor, se libera el DNA y entonces, con el sitio operador desocupado, la RNA polimerasa puede transcribir los otros genes *lac* y la célula puede producir las proteínas necesarias para metabolizar la lactosa.

En el caso de las proteínas recombinantes, comúnmente el vector de expresión en el que está clonado el gen que codifica para la proteína contiene el operón *lac* o una parte del mismo para que la síntesis de la proteína sea inducida por un inductor del sistema de la lactosa.

2.2.1.4.2. Mutagénesis sitio-dirigida

Un campo importante de aplicación de la producción de proteínas es en la adaptación de proteínas a aplicaciones específicas a través de **mutagénesis sitio-dirigida**.

Además, a través de este método es posible estudiar más a fondo una enzima para conocer datos importantes acerca del papel que juegan ciertos residuos de aminoácidos en la catálisis, unión de sustrato(s), oligomerización, entre otras cosas, convirtiendo a la mutagénesis sitio-dirigida en una herramienta indispensable en la práctica de la enzimología.

La mutagénesis sitio-dirigida consiste, como su nombre lo sugiere, en crear una modificación puntual específica en un gen. En un procedimiento, se puede partir de un plásmido recombinante y se corta el fragmento que se desea mutar con endonucleasas de restricción, para posteriormente insertar un fragmento sintético con la secuencia mutada y ligarlo con la DNA ligasa (Figura 15A). Este método tiene la desventaja de que existe la posibilidad de que no haya sitios de restricción cercanos al sitio donde se pretende hacer la mutación, lo cual implicaría sintetizar un fragmento más grande. Una alternativa es utilizar una hebra de DNA plasmídico recombinante y un oligonucleótido sintético como iniciador en la replicación del gen de interés con DNA polimerasa I (Figura 15B). Ésta, bajo la dirección de la hebra que se está replicando, ensambla los cuatro dNTPs en una cadena polinucleotídica complementaria que se alarga en la dirección $5' \rightarrow 3'$. El oligonucleótido usado debe contener un segmento corto de un gen con la secuencia de bases conteniendo la modificación que se desea. Este iniciador se hibridizará con la secuencia silvestre correspondiente siempre y cuando existan pocos pares de

Antecedentes

bases que no se complementen y la extensión del iniciador por la DNA polimerasa I y su ligación final por la DNA ligasa producen el gen alterado deseado, que puede insertarse en un organismo apropiado para generar en grandes cantidades el DNA mutante o su correspondiente RNA, produciendo así una proteína específicamente alterada o un organismo mutante.

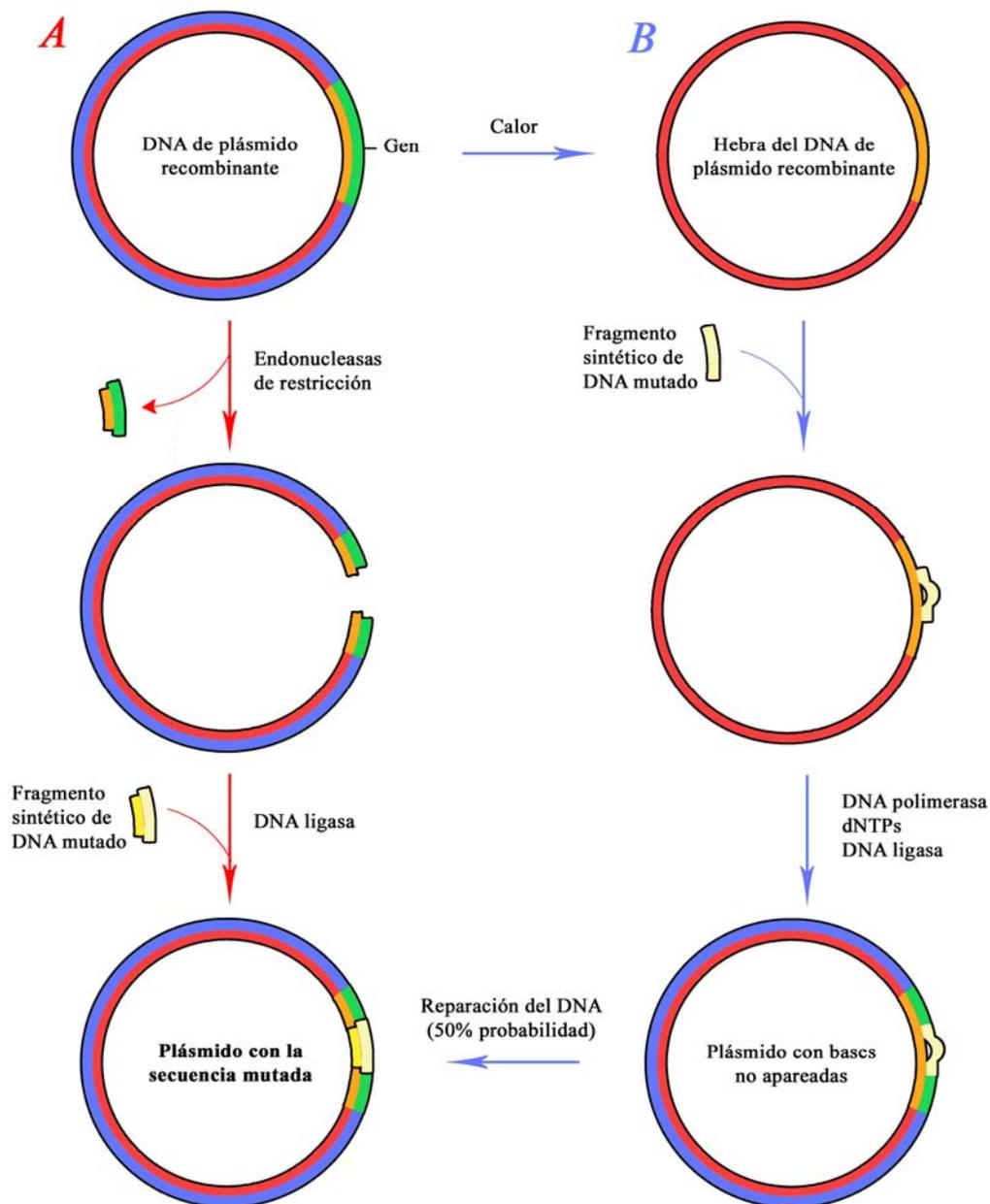


Figura 15. Esquema de la mutagénesis sitio-dirigida. Método basado en enzimas de restricción (A) y método basado en la PCR (B).

2.2.2.2. Cuerpos de inclusión

Las bacterias, y especialmente la enterobacteria *E. coli*, son organismos extremadamente deseables para la bio-producción de proteínas, no sólo para propósitos de preparación a gran escala sino también para estudios proteómicos y genómicos estructurales y funcionales (Yokohama, 2003). En la bien estudiada biofábrica *E. coli*, la expresión de genes recombinantes provoca estrés (Allen *et al.*, 1992; Arís *et al.*, 1998; Cserjan-Puschmann *et al.*, 1999; Harcum & Bentley, 1999; Schweder *et al.*, 1999; Hoffman & Rinas, 2000; Lin *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2002) y por lo tanto, provoca la expresión de grupos de genes en respuesta a éste (Rinas, 1996; Gill *et al.*, 2000; Jürgen *et al.*, 2000; Schweder *et al.*, 2002). Además la carga metabólica asociada con la biosíntesis y el procesado de las proteínas recombinantes promueve una adaptación completa del metabolismo celular (Hoffman & Rinas, 2000; Weber *et al.*, 2002). Esta condición y el impacto de las respuestas al estrés en la fisiología celular afectan la replicación (Wegrzyn & Wegrzyn, 2002) y estabilidad (Corchero & Villaverde, 1998; Hoffman & Rinas, 2001) del plásmido, así como el crecimiento y la viabilidad de las células (Viaplana & Villaverde, 1996; Schmidt *et al.*, 1999).

Por otro lado, el estado de la proteína producida no siempre es el adecuado para su uso inmediato. La expresión heteróloga de genes foráneos en *E. coli* a menudo lleva a la producción de las proteínas expresadas como polipéptidos proteolíticamente degradados (Enfors, 1992) o como agregados proteicos no funcionales e insolubles llamados **cuerpos de inclusión** (Georgiou & Valax, 1996). Esto se debe a que las células bacterianas a menudo son incapaces de plegar adecuadamente las cantidades tan grandes de proteína sobre-expresada, que para

Antecedentes

ellas resulta inútil y posiblemente tóxica, y las secuestran como agregados insolubles.

Los cuerpos de inclusión, que también están presentes en células eucarióticas como un grupo de agregados estructuralmente complejos (Kopito, 2000), ocurren por el depósito de polipéptidos mal o parcialmente plegados debido a las interacciones entre los parches hidrofóbicos que exponen. Se pueden observar por microscopía electrónica como partículas de hasta $2\ \mu\text{m}^3$ y por microscopía de transmisión electrónica como agregados que carecen de estructura definida (Figura 16).

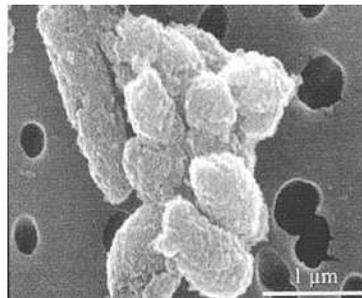


Figura 16. Micrografía electrónica de cuerpos de inclusión de *E. coli*.

Imágenes de barrido de estas partículas purificadas revelan formas cilíndricas u ovoides con superficies de diferente textura. La mayoría de los cuerpos de inclusión se encuentran en el citoplasma bacteriano si se trata de proteínas intracelulares y en el periplasma si se trata de proteínas excretadas. A pesar de que los cuerpos de inclusión son partículas densas, están altamente hidratados y muestran una arquitectura porosa. De un 50 a 95% del material proteico de los cuerpos de inclusión es proteína recombinante, y se ha observado que una gran parte de la proteína en los cuerpos de inclusión posee la estructura secundaria nativa de la proteína (Oberg *et al.*, 1994; Przybycien *et al.*, 1994), aunque en otros se ha observado un incremento en la estructura de láminas β a

Antecedentes

expensas de las hélices α que son predominantes en la forma soluble (Przybycien *et al.*, 1994). Los polipéptidos que forman los cuerpos de inclusión son, por lo menos en gran medida, biológicamente inactivos aunque se ha reportado una actividad enzimática residual importante en unos cuantos cuerpos de inclusión formados a partir de genes que codifican para enzimas (Worrall & Goss, 1989; Tokatlidis *et al.*, 1991).

En ocasiones, la agregación se puede evitar siguiendo varias estrategias: 1) controlando los parámetros del proceso de expresión de la proteína recombinante, por ejemplo reduciendo la temperatura o la concentración del agente inductor, lo que en ambos casos lleva a una reducción de la velocidad de expresión del gen recombinante. 2) Rediseñando la proteína mediante la mutagénesis de aminoácidos que pudieran dificultar el pliegue del polipéptido. 3) Añadiendo a la secuencia de bases de la proteína de interés una secuencia señal de una proteína bacteriana secretada, de manera que se secrete al periplasma bacteriano donde la secuencia señal será eliminada por una proteasa bacteriana. 4) Co-expresando junto con la proteína de interés vectores que contengan genes clonados que codifiquen para chaperonas. Sin embargo, estas estrategias no tienen el mismo grado de éxito para diferentes polipéptidos y en consecuencia, la producción de proteína soluble es todavía un proceso de prueba y error.

La mayoría de las proteínas no bacterianas producidas en sistemas bacterianos son incapaces de alcanzar su conformación nativa, especialmente a altas velocidades traduccionales. Las chaperonas bacterianas, que se producen bajo condiciones estresantes, están involucradas en el procesado conformacional de una fracción de polipéptidos celulares y pueden también asistir a las proteínas recombinantes. Algunas de las chaperonas facilitan el plegamiento del polipéptido

Antecedentes

(Schwarz *et al.*, 1996), otras ayudan a evitar la agregación (Ehrnsperger *et al.*, 1997; Veinger *et al.*, 1998) y algunas participan en el repliegue de agregados proteicos (Ben-Zvi & Goloubinoff, 2001).

Debido a que en las células bacterianas los niveles de chaperonas no son altos, aun cuando se estimule la respuesta al choque térmico, la co-expresión de genes que codifiquen para chaperonas seleccionadas junto con el gen recombinante de interés ha resultado en un mejor plegamiento y una mayor solubilidad en muchos casos (Wall & Plückthun, 1995; Georgiou & Valax, 1996). Además, algunas chaperonas actúan conjuntamente como es el caso de DnaK, DnaJ y GrpE, o GroEL y GroES (Schröder *et al.*, 1993; Walter, 2002), aun cuando estas chaperonas también funcionan en forma independiente.

Las proteínas incompletamente o mal plegadas no sólo son el objeto de las chaperonas para ser plegadas o replegadas, sino también son el objeto de las proteasas para su degradación. Aun cuando la proteólisis puede restringirse usando cepas deficientes de proteasas (Corchero *et al.*, 1996; Park *et al.*, 1999; Park, 2002; Ignatova *et al.*, 2003), no se ha establecido aún la genética apropiada para producir proteína soluble. El uso de este tipo de cepas conduce a la producción de una mayor cantidad de proteína en la fracción insoluble y de cuerpos de inclusión más grandes (Corchero *et al.*, 1996; Rosen *et al.*, 2002).

La inhibición de la formación de cuerpos de inclusión no puede ser abordada de manera racional. Por otra parte, los cuerpos de inclusión pueden ser fácilmente purificados y usados como una fuente de polipéptido relativamente puro, cuyo plegamiento *in vivo* no fue suficiente para alcanzar su conformación nativa. Por lo tanto, el repliegue *in vitro* de la proteína purificada de los cuerpos de inclusión es una opción para obtener proteína funcional cuando el rendimiento de su forma

Antecedentes

soluble es pobre. No obstante, el repliegue de proteína agregada no es un procedimiento sencillo ni de éxito asegurado, y requiere de optimización para productos específicos. La estrategia general para recuperar la proteína en forma nativa y activa, a partir de los cuerpos de inclusión incluye tres pasos consecutivos: aislamiento y lavado de los cuerpos de inclusión para homogeneizar el contenido proteico y eliminar contaminantes; solubilización de la proteína agregada y repliegue de la proteína solubilizada. Usualmente, la renaturalización es el paso más delicado y determina la eficiencia total del proceso; esto se ve grandemente afectado por el grado de heterogeneidad de la mezcla de las moléculas co-agregadas, lo que a su vez depende de la proteína dada. Existen varios protocolos alternativos que pueden utilizarse de acuerdo con esta estrategia (Tabla 1), el procedimiento elegido dependerá finalmente del rendimiento y de la pureza final deseados de la proteína recombinante.

Tabla 1. Estrategias para replegar y recuperar proteína a partir de cuerpos de inclusión bacterianos (Villaverde & Carrió, 2003).

Lisis celular	Aislamiento	Solubilización	Repliegue	Comentarios
Sonicación Lisis química Homogeneización Presión hidrostática	Centrifugación (12,000 rpm) + lavado (detergentes y desnaturizante en concentraciones bajas) Centrifugación de gradiente	<i>Desnaturalizantes:</i> (urea 8 M ó Gdn-HCl 6 M) <i>Agentes reductores:</i> DTT, DTE, β-mercaptoetanol <i>Agente quelante:</i> EDTA ó EGTA <i>Detergentes:</i> SDS, CTAB <i>Agentes reductores:</i> DTT, DTE, β-mercaptoetanol <i>Agente quelante:</i> EDTA ó EGTA <i>pH extremo</i> Concentraciones bajas de desnaturizante	Eliminación de los desnaturizantes en exceso por dilución o intercambio de amortiguador: Diálisis Diafiltración Cromatografía de filtración de gel Inmovilización en soporte sólido Formación simultánea de enlaces disulfuro por oxidación: Catalizador metálico/agente reductor Sistema de oxido-reestructuración (tioles) Disulfuro isomerasa Eliminación del detergente en exceso (métodos usados para los desnaturizantes) Oxidación: Catalizador metálico/agente reductor Sistema de oxido-reestructuración (tioles) Disulfuro isomerasa pH ajustado a 7.5—9.5	Este método usualmente requiere pasos de concentración adicionales. Las concentraciones residuales de detergente pueden interferir con el ensamblaje de proteínas oligoméricas. Las condiciones extremas de pH pueden causar modificaciones químicas irreversibles.

Objetivos

3. OBJETIVO GENERAL

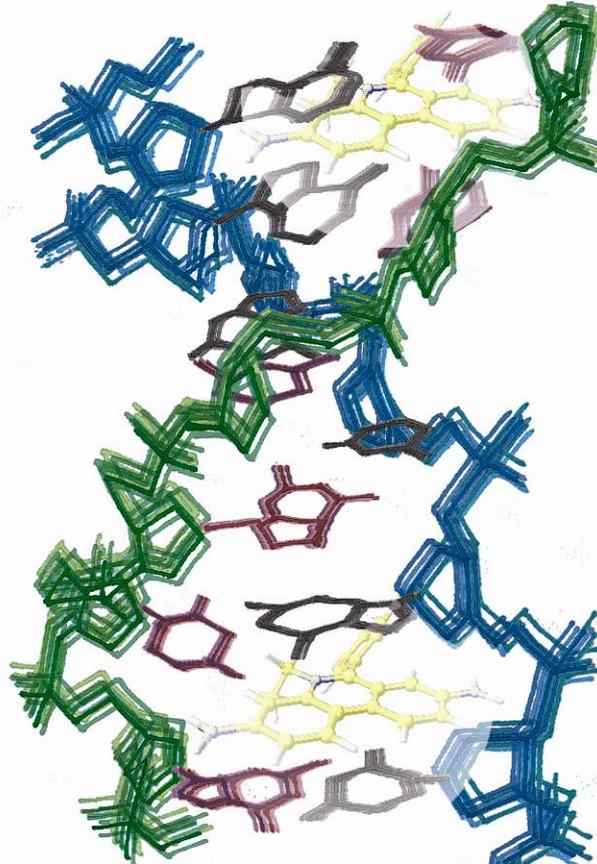
Sobreexpresar en forma activa a la enzima betaína aldehído deshidrogenasa de hoja de amaranto en un sistema de expresión adecuado.

3.1. Objetivos particulares

1. Sobreexpresar la enzima betaína aldehído deshidrogenasa de hoja de amaranto en células de *E. coli* transformadas con el vector pBKS-*ahybadh*.

En caso de que se produzca la proteína como cuerpos de inclusión:

2. Solubilizar los cuerpos de inclusión obtenidos de *E. coli* y replegar la proteína a su estructura nativa.
3. Co-expresar chaperonas bacterianas para que éstas ayuden a la AhyBADH a plegarse en su estructura nativa.
4. Sobreexpresar en células de *S. cerevisiae* liberando el gen *ahybadh* de pBKS-*ahybadh* y clonándolo en un vector para expresión en levadura.



Intercalation/天王

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Materiales

4.1.1. Material biológico

Células de *E. coli* de la cepa
BL21(DE3)pLys (Stratagene)

pSAL3 (Mascorro-Gallardo, 2000)

Células de *S. cerevisiae* de la cepa
W303-1A (Nehlin *et al.*, 1989)

SacI (Fermentas)

NotI (Fermentas)

SalI (Fermentas)

Materiales y métodos

pBKS (Stratagene)

*Xho*I (Fermentas)

pRS6 (Mascorro-Gallardo, 2000)

4.1.2. Equipo

Balanza analítica Ohaus

Potenciómetro Beckman

Cámara de agitación orbital con temperatura controlada de Lab Line Instruments

Sonicador Vibracell de SONICS

Centrífuga Sorvall RC-5 Plus

Transiluminador de luz blanca

Equipo de electroforesis Hoefer Scientific

Transiluminador de luz UV

Espectrofluorómetro Shimadzu 5000U

Ultracentrífuga Sorvall

Espectrofotómetro Beckman DU 7500

Vórtex Thermolyne

4.1.3. Reactivos

4.1.3.1. Merck

Ácido acético

Fosfato dibásico de potasio

Ácido clorhídrico

Fosfato monobásico de potasio

EDTA

Glicerol

Etanol

Metanol

Materiales y métodos

4.1.3.2. Sigma-Aldrich

Acrilamida	IPTG
Adenina	Leucina
Ampicilina	Lisina
Arginina	Medio de cultivo Luria-Bertani
Betaína aldehído	NAD ⁺
Bis-acrilamida	SDS
Cloruro de potasio	Tetraciclina
DTT	Triptofano
Glicina	Tris
HEPES	Zimoliasa
Hidróxido de potasio	β -mercaptoetanol
Hidróxido de sodio	

4.1.3.3. Otros

Albúmina sérica bovina (GIBCO)	Reactivo de Bradford (BIO-RAD)
Base de nitrógeno sin aminoácidos (Difco)	Sulfato cúprico (Baker)
D-glucosa (GIBCO)	

4.2. Métodos

4.2.1. Determinación de la actividad AhyBADH

La actividad enzimática se determinó mediante un ensayo espectrofotométrico estándar ya descrito (Valenzuela-Soto & Muñoz-Clares, 1993). La oxidación de la betaína aldehído por la BADH con la reducción concomitante de NAD^+ produce glicina betaína y NADH. Al tratarse de una estequiometría 1:1, la aparición de NADH es proporcional a la aparición de glicina betaína y, por ende, a la actividad enzimática. Con este fundamento, la actividad enzimática se determinó espectrofotométricamente siguiendo el incremento de absorbancia a 340 nm. Se utilizaron 400 μL de amortiguador de ensayo (HEPES-KOH 100 mM, pH 8.0 y EDTA 1 mM) con betaína aldehído (BA) 0.2 mM y NAD^+ 0.5 mM, y 100 μL del extracto celular. La forma del incremento en la absorbancia con respecto al tiempo es lineal durante los primeros segundos.

La actividad BADH se calculó usando la siguiente ecuación:

$$a = \frac{dA}{dt} \frac{V_{\text{ensayo}}}{V_{\text{enzima}}} \frac{1}{\epsilon_{\text{NADH}}^{340 \text{ nm}}}$$

donde a es la actividad enzimática dada en mU/mL; dA/dt es el cambio de la absorbancia a 340 nm con respecto al tiempo, *i.e.* la pendiente de la recta inicial; V_{ensayo} es el volumen final del ensayo en mL; V_{enzima} es el volumen usado de la preparación enzimática en mL; y $\epsilon_{\text{NADH}}^{340 \text{ nm}}$ es el coeficiente de absortividad molar del NADH a 340 nm con un valor de $6.22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad necesaria para convertir 1 μmol de sustrato en producto en un minuto bajo estas condiciones experimentales.

Materiales y métodos

Para una determinación de actividad enzimática con mayor sensibilidad se realizó el estudio de actividad por fluorescencia a longitudes de onda de excitación y de emisión de 340 nm y 459 nm, respectivamente, utilizando el mismo medio de ensayo.

4.2.2. Determinación de proteína

Se determinó la cantidad de proteína soluble total por el método de Bradford (Bradford, 1976) con albúmina sérica bovina (BSA) como estándar. La determinación espectrofotométrica de proteína por este método se hizo realizando una curva patrón a 595 nm con 5, 10, 15, 20 y 30 µg totales de BSA y 5 mL de disolución acuosa de colorante azul brillante de Coomassie al 20% v/v.

Después de realizar la curva patrón, se interpoló la masa de proteína total contenida en la muestra mediante un análisis de regresión lineal utilizando la absorbancia obtenida para cada una de las muestras preparadas de manera semejante a las disoluciones de la curva patrón.

4.2.3. Electroforesis desnaturante en gel de poliacrilamida

Con la finalidad de verificar la presencia de la enzima en los extractos libres de células, éstos fueron sometidos a una electroforesis desnaturante bajo condiciones reductoras utilizando dodecil sulfato de sodio (SDS) como desnaturante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), de acuerdo con el procedimiento estándar descrito por Laemmli (Laemmli, 1970). Bajo estas condiciones desnaturantes, la migración de las proteínas se determina por su

Materiales y métodos

masa molar y no por su carga, pues en estas condiciones el SDS confiere en forma homogénea carga negativa a todas las proteínas. Este efecto, junto con el tratamiento con un agente reductor como el β -mercaptoetanol, hace que las proteínas se comporten como partículas lineales con igual densidad de carga.

El gel de poliacrilamida consta de dos zonas: la superior de concentración de proteínas (acrilamida al 4% v/v, pH 6.8) seguida de una zona de separación de las mismas (acrilamida al 10% v/v, pH 8.3).

El gel de poliacrilamida para cada SDS-PAGE se preparó en 2 etapas adicionando y mezclando los reactivos en el orden indicado en la Tabla 1, iniciando por el gel separador y después con el gel concentrador. Se cargó el gel separador entre las placas de vidrio y una vez que gelificó se procedió a la preparación y carga del gel concentrador.

Tabla 1. Reactivos necesarios para la preparación de un gel para SDS-PAGE.

Reactivo	Gel separador	Gel concentrador
	V (mL)	V (mL)
Acrilamida/bis-acrilamida (1)	3.33	0.67
Amortiguador de separación (2)	2.50	--
Amortiguador de concentración (3)	--	1.25
SDS (4)	0.10	0.05
Agua desionizada	4.00	3.00
Persulfato de amonio (5)	0.10	0.10
TEMED	0.013	0.013

La composición de las disoluciones fue (1) acrilamida al 30% m/v, bis-acrilamida al 2.7% m/v; (2) Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8; (3) Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8; (4) SDS al 10% m/v; (5) persulfato de amonio al 10% m/v.

Se cargó amortiguador para electrodos (Tris 0.025 M, glicina 0.192 M y SDS al 0.1% m/v) en el tanque del equipo para electroforesis hasta cubrir completamente los electrodos y el gel.

Materiales y métodos

Cada muestra fue desnaturalizada agregando un volumen igual de amortiguador para muestra 2X (Tris 0.125 M, SDS al 4% m/v, glicerol al 20% v/v, β -mercaptoetanol al 10% v/v y una pizca de azul de bromofenol) e incubando en baño maría a ebullición durante al menos 3 minutos. Se cargaron 10 μ L de muestra en cada carril y se ajustó la fuente de poder a un voltaje de 115 V, una corriente de 20 mA y una potencia de 5 W como límites máximos para cada gel.

El revelado y fijación de los geles se hizo con una disolución de azul brillante de Coomassie 0.125% m/v, metanol al 50% v/v y ácido acético al 10% v/v. El exceso de colorante se eliminó con una disolución acuosa de metanol al 50% v/v y ácido acético al 10% v/v.

4.2.4. Sobreexpresión de la AhyBADH en células de *E. coli* transformadas con pBKS-*ahybadh*

Se crecieron células de *E. coli* de la cepa BL21(DE3)pLys transformadas con el plásmido pBKS-*ahybadh* en medio de cultivo Luria-Bertani (LB) líquido con ampicilina 75 μ g/mL hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm de 0.4-0.6. Se agregó IPTG hasta una concentración final de 200 μ M y se dejó agitando la suspensión a 250 rpm durante 4 horas a 37 °C. Se centrifugó la suspensión a 2,000 g durante 10 min a 4 °C y se decantó la mezcla; el precipitado se resuspendió en 10 mL del amortiguador de extracción A (HEPES-KOH 50 mM, pH 7.4, EDTA 1 mM, glicerol 10% v/v, β -mercaptoetanol 10 mM). Se hizo la lisis celular mediante sonicación a una amplitud de 40 con una salida de 12 W, con pulsos de 10 segundos durante 1 min. Se centrifugó la suspensión a 2,000 g durante 10 min a 4 °C y se decantó la mezcla; el precipitado se resuspendió en 200 μ L del

Materiales y métodos

amortiguador de extracción A. Se realizó una SDS-PAGE (Laemmli, 1970) utilizando alícuotas de 10 μ L de ambas fases y AhyBADH pura extraída como control positivo. Como control negativo se utilizaron alícuotas de las fases obtenidas de células que recibieron el mismo tratamiento excepto por la adición de IPTG.

4.2.5. Solubilización y repliegue de los cuerpos de inclusión

En un primer experimento se incubó el precipitado obtenido como se indica en 4.2.4. con urea 6 M durante 24 horas a 4 °C. En otro experimento, se resuspendió el paquete celular obtenido después de la inducción realizada tal y como se describió en 4.2.4. en 10 mL del amortiguador B (EDTA 1 mM, DTT 10 mM, pH 6.9 y fosfatos de potasio monobásico y dibásico 50 mM) para después sonicar a una amplitud de 40 con una salida de 12 W, con pulsos de 10 segundos durante 2 min. Se centrifugó la suspensión a 10,000 g durante 15 min a 4 °C y se decantó la mezcla tomando alícuotas de 200-500 μ L de ambas fases; se lavó el precipitado resuspendiéndolo en 5 mL del amortiguador B y centrifugándolo a 10,000 g durante 10 min a 4 °C. Tras decantar, se lavó el precipitado con 5 mL del amortiguador C (el amortiguador B con Triton-X 100 0.5% m/v), posteriormente con 5 mL del amortiguador B y finalmente se resuspendió en 5 mL del amortiguador D (el amortiguador C con urea 8 M). Se dejó incubando durante dos horas a 30 °C con una agitación de 250 rpm, tras lo cual se centrifugó a 10,000 g durante 20 min a 4 °C. Se colocaron 200 μ L del sobrenadante en una bolsa de diálisis y se dializó frente a 2000 volúmenes del amortiguador B con agitación moderada a temperatura ambiente durante 24 horas.

4.2.6. Transformación de células de *E. coli* previamente transformadas con pBKS-*ahybadh* con vectores que contienen chaperonas de *P. aeruginosa*

Se cuenta con dos colecciones de chaperonas de *P. aeruginosa* clonadas en vectores de expresión para *E. coli*; la primera consiste de 80 plásmidos distintos que contienen clonado el gen de una chaperona y la segunda consiste de plásmidos que contienen clonados los genes de 3 chaperonas diferentes. Se transformaron por electroporación 100 μ L de células electrocompetentes de *E. coli*, previamente transformadas con pBKS-*ahybadh*, con 2 μ L de ambas colecciones de plásmidos por separado en un volumen total de 1 mL de suspensión en medio SOC. Se extendieron 50 μ L de las células recién transformadas en 8 cajas con medio LB sólido con ampicilina 100 μ g/mL y tetraciclina 100 μ g/mL, y se crecieron a 30 °C durante toda la noche. Debido al crecimiento bacteriano excesivo que no permitía la identificación de colonias aisladas se sembraron colonias al azar en nuevas cajas debidamente marcadas (en promedio 20 colonias por caja, 15 cajas en total) y se dejaron creciendo con ambos antibióticos.

4.2.7. Sobreexpresión de la AhyBADH en células de *E. coli* co-transformadas con pBKS-*ahybadh* y con vectores con chaperonas de *P. aeruginosa*

Se inocularon tubos con 5 mL de medio LB conteniendo ampicilina 100 μ g/mL concentración final y tetraciclina 100 μ g/mL concentración final con cada una de las colonias sembradas de *E. coli* y se dejaron creciendo a 37 °C con

Materiales y métodos

agitación de 250 rpm hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm de 0.4-0.6. Una vez alcanzada una densidad óptica en este intervalo, se agregó IPTG hasta una concentración final de 200 μ M y se dejó induciendo de 3 a 4 horas a 37 °C. Transcurrido este tiempo, se centrifugó a 3,200 g durante 5 min y se resuspendió el paquete celular en 1 mL de amortiguador de extracción A en un tubo eppendorf. A la suspensión se agregaron 25 μ L de lisozima y se incubó a 37 °C durante 20 min. Pasado este tiempo se hizo la lisis celular succionando y expulsando suavemente la suspensión con una aguja hipodérmica. Se centrifugó a 7,700 g durante 5 min y se decantó el sobrenadante en un tubo eppendorf nuevo. Se hizo una SDS-PAGE con alícuotas de 10 μ L de algunos extractos para verificar que la lisis celular fuera efectiva. En todos los extractos se determinó si existía actividad BADH usando el ensayo estándar descrito.

4.2.8. Electroforesis en geles de agarosa

Con la finalidad de comprobar la presencia de ciertos fragmentos de DNA, los productos de las digestiones, ligaciones y purificaciones de DNA fueron sometidos a electroforesis en geles de agarosa al 1% ó 1.2% m/v.

Cada gel se preparó fundiendo la agarosa en amortiguador TAE (Tris 4 mM, acetato de sodio 8 mM, EDTA disódico 100 μ M, pH 7.5-7.8 ajustado con ácido acético glacial) con bromuro de etidio 0.05 μ g/mL. Se agregó amortiguador de tñido 10X (azul de bromofenol 0.25%, xilén-cianol 0.25% y glicerol 50% v/v) a cada digestión para lograr una dilución 1:10 y se cargaron 20 μ L de muestra en los carriles del gel, utilizando el marcador 1 kb de Gibco como referencia. Cada gel se

Materiales y métodos

corrió durante aproximadamente una hora inmerso en amortiguador TAE. El revelado de los geles se hizo mediante irradiación con luz UV.

4.2.9. Inserción del gen *ahybadh* de hoja de amaranto en pRS6 a partir de pBKS-*ahybadh*

Se partió del vector pBKS-*ahybadh* que se utilizó previamente. pBKS es un plásmido de ~3.0 kb derivado del plásmido pUC19 que contiene un origen de replicación, un gen de resistencia a ampicilina y varios sitios de restricción como *SacI*, *NotI*, *BamHI*, *Sall* y *XhoI*, entre otros (Figura 1).

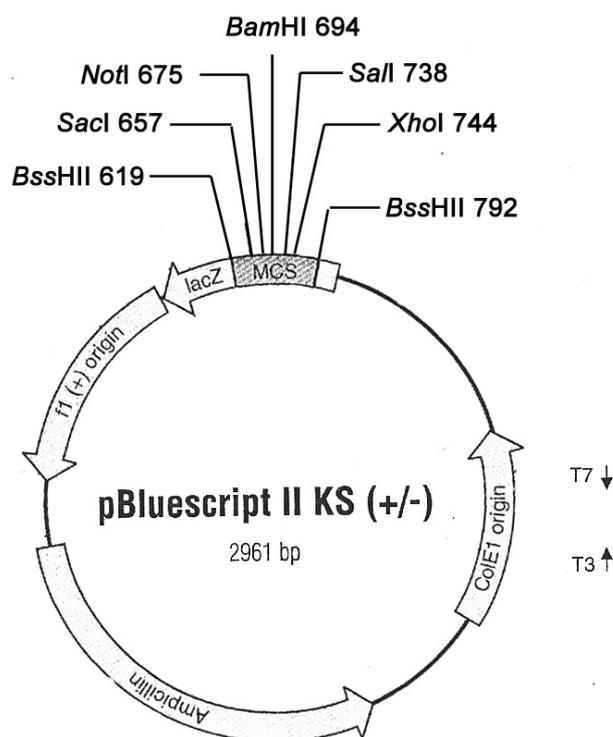


Figura 1. Esquema del plásmido pBKS. Diagrama que señala algunos de sus sitios de restricción.

El laboratorio cuenta con DNA correspondiente al vector pBKS-*ahybadh* como producto de un trabajo previo. Se determinó la concentración de 1 μ L de este

Materiales y métodos

DNA diluyéndolo en 500 μL de agua, utilizando agua como blanco a una longitud de onda de 260 nm. Se agregaron 2 μL del amortiguador provisto por la casa productora de las enzimas, 2 μL del DNA, 0.25 μL de la enzima correspondiente y el resto de agua hasta 20 μL . Enseguida se agitaron los tubos levemente y después se centrifugaron brevemente para bajar el líquido. Se incubaron ambos tubos a 37 °C con agitación de 250 rpm durante 2 horas.

El vector para levadura pRS6 (Figura 2), de 6.7 kb de longitud, tiene varios sitios de restricción en su región polylinker, el gen *his3* que le confiere la capacidad de sintetizar histidina a la célula hospedera, lo que lo convierte en un marcador seleccionable de tipo auxotrófico, en este caso a histidina, y el gen promotor *pma1* del gen que codifica para la ATPasa de protones en levadura. Éste es un promotor fuerte que propicia la producción de la proteína clonada de manera constitutiva.

Se seleccionaron las enzimas de restricción *XhoI* y *NotI* para linealizar el vector pRS6, ya que no existen sitios de corte internos para estas enzimas y además porque también pueden ser usadas para liberar el gen *ahybadh* de pBKS-*ahybadh*, y así poder ensamblar el vector linealizado con el inserto liberado ligando los extremos complementarios.

Materiales y métodos

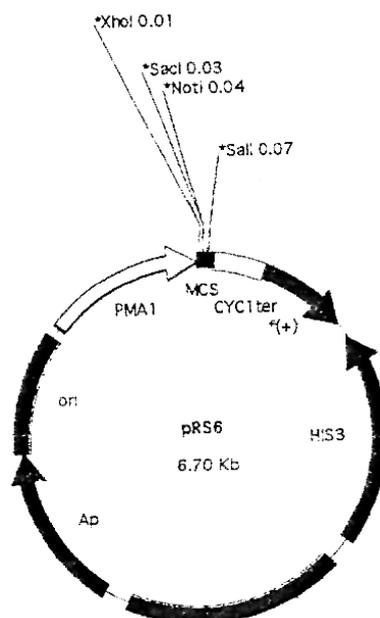


Figura 2. Esquema del vector pRS6 para levadura. Diagrama que señala algunos de sus sitios de restricción.

Se hizo la incubación simultánea de pBKS-*ahybadh* con las dos enzimas de restricción agregando 2 μ L de *XhoI*, 1 μ L de *NotI*, 5 μ L del amortiguador de *NotI*, 5 μ L de DNA y el resto de agua hasta 50 μ L, a 37 °C con agitación de 250 rpm durante 2 horas. Se cortó pRS6 de la misma manera y se determinó la relación relativa de concentraciones entre el inserto liberado y el vector linealizado. Se ligó el gen *ahybadh* con el vector de expresión pRS6 linealizado utilizando el triple de inserto para generar el vector pRS6-*ahybadh* mediante ligación con ligasa durante toda la noche. El producto de la incubación se digirió con *XhoI* y *NotI* también durante toda la noche a 37 °C.

4.2.10. Transformación de células de *S. cerevisiae* con pRS6-*ahybadh*

Se crecieron células de *S. cerevisiae* de la cepa W303-1A en 5 mL de medio rico YPD (extracto de levadura 1% m/v, bactopectona 2% m/v y glucosa 2% m/v) a 30 °C con agitación a 200 rpm durante toda la noche hasta una densidad óptica a 600 nm de 0.4-0.8 unidades de absorbancia. Una vez alcanzada esta densidad óptica, se inoculó el volumen de medio estéril suficiente para tener 50 mL de cultivo y se dejó en incubación a las mismas condiciones hasta una densidad óptica a 600 nm de 0.4-0.8. Se transfirió la suspensión a un tubo para centrifuga de 50 mL y se centrifugó a 3,000 g durante 5 min, tras lo cual se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 25 mL de agua desionizada estéril. Se centrifugó la suspensión de igual manera y se resuspendió la pastilla en 900 µL de agua desionizada estéril para luego transferirla a tubos para microcentrifuga de 1.5 mL. Se centrifugó la suspensión a 13,000 g durante 1 min y se resuspendió la pastilla en acetato de litio 100 mM hasta un volumen final de 1 mL; se incubó la suspensión a 30 °C durante 10 min. Se tomaron 100 µL de la suspensión y se transfirieron a un nuevo tubo de 1.5 mL para ser centrifugados a máxima velocidad en una microcentrifuga durante 1 min. Después de eliminar el sobrenadante, se agregaron los siguientes reactivos en este orden: 240 µL de polietilenglicol 50% m/v, 36 µL de acetato de litio 1.0 M, 50 µL de esperma de salmón 2 mg/mL, 15 µL del DNA plasmídico y 19 µL de agua desionizada estéril, para tener un volumen final de 360 µL. Se agitó con vórtex hasta lograr la resuspensión total de la pastilla. Se incubó la suspensión a 30 °C durante 30 min y después se dio choque térmico a la suspensión a 42 °C durante 30 min. Se centrifugó a máxima velocidad en microcentrifuga durante un min y se eliminó el sobrenadante. Se agregó 1 mL de

Materiales y métodos

agua desionizada estéril y se resuspendió agitando suavemente mediante succión con una micropipeta. Se agitó con vórtex brevemente para asegurar una resuspensión homogénea. Se usaron 250 μL de la suspensión de células transformadas para crecerlas en medio mínimo SD sólido sin histidina (YNB 0.7% m/v, glucosa 2% m/v, MES 50 mM, pH 6.0, leucina 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, uracilo 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$, triptófano 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$, adenina 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y agar 2% m/v) durante 2 a 4 días a 30 °C.

4.2.11. Inserción del gen *ahybadh* en pSAL3 a partir de pRS6-*ahybadh*

El vector para levadura pSAL3 (Figura 3) tiene varios sitios de restricción en su polylinker, entre los cuales están sitios para *XhoI* y *NotI*.

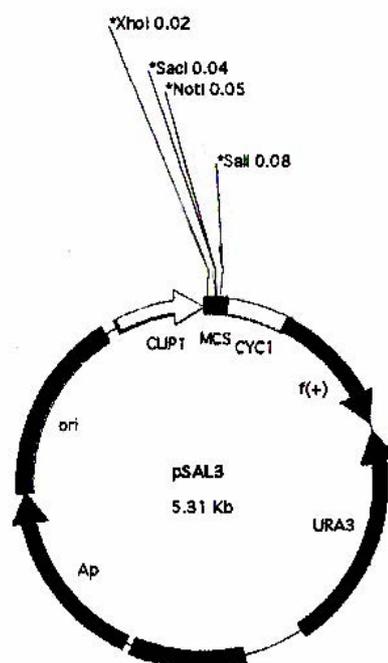


Figura 3. Esquema del vector pSAL3 para levadura. Diagrama que señala algunos de sus sitios de restricción

Materiales y métodos

Tiene también el gen *amp^R* que le confiere a la célula hospedera la resistencia a la ampicilina, así como el gen promotor *cup1* que codifica para una metalotioneína de 61 aminoácidos que es capaz de unir hasta 8 átomos de cobre de manera cooperativa a través de 12 residuos de cisteína (Winge *et al.*, 1985). Esta metalotioneína es capaz de formar complejos *in vitro* con el zinc, la plata y el cadmio, aunque *in vivo* sólo protege de la toxicidad del cobre y el cadmio. Este gen se induce solamente por cobre y plata (Hamer *et al.*, 1985; Ecker *et al.*, 1986; Furst *et al.*, 1988). Además, pSAL3 posee el gen *ura3* que confiere a la célula receptora la capacidad de sintetizar uracilo, por lo tanto esto puede ser utilizado para la selección de las células transformadas por auxotrofia a uracilo, además de por resistencia a ampicilina.

Se liberó el gen *ahybadh* de pRS6-*ahybadh*, de la misma manera en que fue liberado de pBKS-*ahybadh*, y se ligó al vector pSAL3, previamente linealizado como se describió anteriormente, para generar el vector pSAL3-*ahybadh*.

4.2.12. Transformación de células de *S. cerevisiae* con pSAL3-*ahybadh*

La transformación se llevó a cabo con el mismo procedimiento que el utilizado con pRS6-*ahybadh*, pero el crecimiento de las células transformadas en medio sólido selectivo se hizo en medio mínimo SD sin uracilo (YNB 0.7% m/v, glucosa 2% m/v, MES 50 mM, pH 6.0, leucina 10 µg/mL, histidina 3 µg/mL, triptófano 3 µg/mL, adenina 3 µg/mL y agar 2% m/v) con ampicilina 100 µg/mL durante 2 a 4 días a 30 °C. Una vez obtenidas colonias, se inocularon 5 mL de medio líquido selectivo sin histidina (YNB 0.7% m/v, glucosa 2% m/v, MES 50 mM, pH 6.0, leucina 10 µg/mL, uracilo 3 µg/mL, triptófano 3 µg/mL y

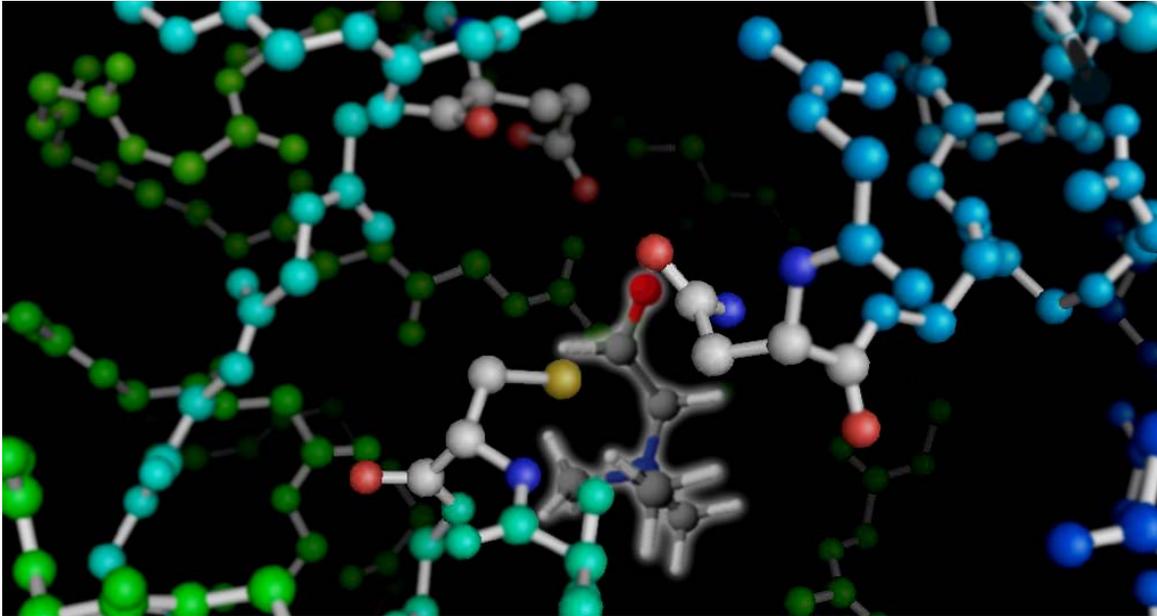
Materiales y métodos

adenina 3 µg/mL) por cada colonia y se dejaron crecer a 30 °C y con agitación de 200 rpm durante toda la noche. Se tomaron 2 mL de la suspensión y se transfirieron a un tubo eppendorf en donde se centrifugaron y se decantó el medio de cultivo. Se resuspendió la pastilla celular en 1 mL de agua y se volvió a centrifugar. Se resuspendió la pastilla en 1 mL de amortiguador que contiene Tris 50 mM, pH 7.5, β-mercaptoetanol 0.3% v/v y EDTA 10 mM. Se centrifugó y decantó el tubo de forma que quedaran 100 µL de amortiguador en los cuales se resuspendió la pastilla. Se agregaron 25 µL de una disolución de Zimoliasa para tener 500 U finales y se incubó la suspensión a 37 °C con agitación suave durante al menos 1 hora. Se agregaron entonces 25 µL de SDS 10% m/v y se mezcló para homogeneizar; se dejó reposando el tubo durante 1 min. Se agregaron 100 µL de acetato de amonio 7.5 M y se mezcló suavemente. Se incubó a -70 °C durante 15 min para precipitar el resto del DNA y se centrifugó el eppendorf durante 5 min. Se transfirió el sobrenadante que contiene el DNA plasmídico a un tubo nuevo y se agregaron 70 µL de isopropanol. Después de mezclar se centrifugó el tubo durante 5 min y se lavó la pastilla con etanol 70% v/v. Una vez seca la pastilla se resuspendió en 100 µL de amortiguador TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 µM, pH 7.5). Se hizo un gel de agarosa al 1.2% con el producto de la digestión de esta disolución con *XhoI* y *NotI* para comprobar la presencia del plásmido pSAL3-*ahybadh* en las células transformadas.

4.2.13. Sobreexpresión de la AhyBADH en células de *S. cerevisiae* transformadas con pSAL3-*ahybadh*

Se crecieron células de *S. cerevisiae* transformadas con el vector pSAL3-*ahybadh* en 50 mL de medio líquido selectivo (YNB 0.7% m/v, glucosa 2% m/v, MES 50 mM, pH 6.0, leucina 10 µg/mL, histidina 3 µg/mL, triptófano 3 µg/mL y adenina 3 µg/mL) sin uracilo, con ampicilina 100 µg/mL, a 25 °C con agitación de 150 rpm hasta una densidad óptica de 0.4-0.8. Una vez alcanzada una densidad óptica en ese intervalo, en un primer estudio cualitativo se indujo la síntesis de la AhyBADH con CuSO₄ a concentraciones finales de 100, 200 y 300 µM durante 3 horas. Después de transcurrido este tiempo, se centrifugó a 2200 g durante 3 min, tras lo cual se resuspendió el paquete celular en 1 mL de agua para volver a centrifugar 8,000 g durante 1 min. Se resuspendió la pastilla en 200 µL del amortiguador de lisis (Tris-HCl 100 mM, pH 8.0, DTT 1 mM, glicerol 20% v/v, EDTA 2 mM y KCl 150 mM) y se agregó además el mismo volumen de perlas de vidrio de 1 mm de diámetro y 12.5 µL de PMSF 40 mM. Se dieron 6 pulsos de 15 segundos en vórtex y se añadieron 200 µL de amortiguador de lisis. Se dio un pulso de 10 segundos en el vórtex y se transfirió a un eppendorf nuevo. Se centrifugó a 8,000 g durante 1 min y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo: el precipitado se resuspendió en 500 µL de amortiguador de lisis y se tomaron alícuotas de 10 µL para una SDS-PAGE. En un segundo experimento, se indujo la síntesis de la BADH con CuSO₄ a concentraciones finales de 25, 50 y 100 µM, durante 4 y 20 horas en dos tipos de células de *S. cerevisiae*, unas transformadas con pSAL3-*ahybadh* y otras sólo con pSAL3. El procedimiento de extracción fue idéntico al ya descrito.

Materiales y métodos



Active Site/天王

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Sobreexpresión de la AhyBADH en células de *E. coli* transformadas con pBKS-*ahybadh*

Se indujo la síntesis de la AhyBADH y se prepararon extractos libres de células de *E. coli* transformadas con pBKS-*ahybadh* mediante el procedimiento descrito en 'Materiales y métodos' (Figura 1).

Resultados y discusión

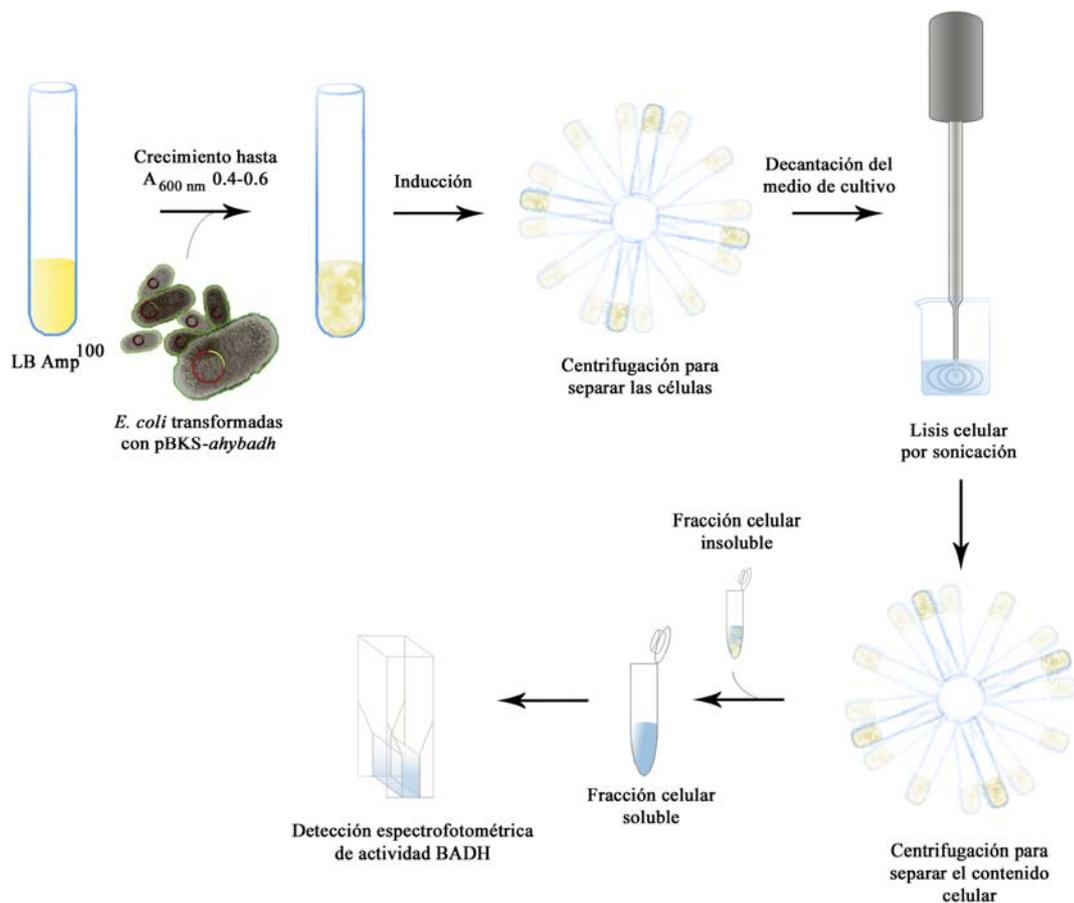


Figura 1. Diagrama de la extracción del contenido intracelular de células de *E. coli* transformadas con pBKS-ahybadh.

Al comparar el patrón electroforético de los extractos obtenidos cuando las células se trataron con IPTG con aquél en donde no se utilizó el inductor (Figura 2) puede observarse que el IPTG induce una mayor síntesis de la AhyBADH en células de *E. coli* transformadas con pBKS-ahybadh, pues en el carril correspondiente al precipitado existe una amplia banda de proteína cuya movilidad electroforética coincide con la de la banda de la AhyBADH purificada a partir de las hojas.

Resultados y discusión

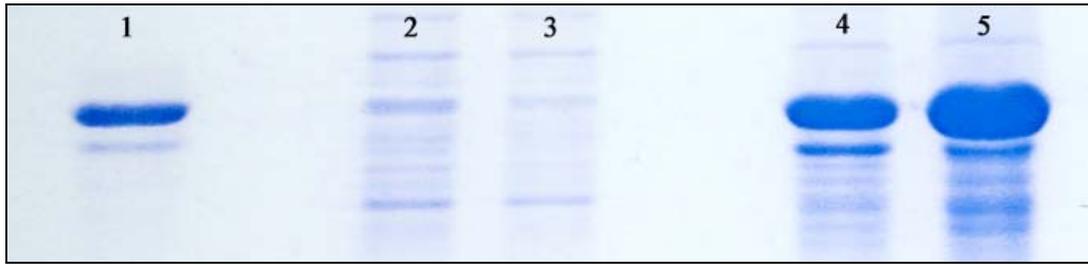


Figura 2. SDS-PAGE de extractos libres de células de *E. coli* transformadas con el plásmido pBKS-*ahybadh*. Carriles: 1) AhyBADH purificada de hojas; 2) y 3) sobrenadantes de los extractos de células no inducidas e inducidas con IPTG, respectivamente; 4) y 5) precipitados de los extractos de células no inducidas e inducidas con IPTG, respectivamente.

Resulta muy interesante que, aun sin inducir la síntesis de la AhyBADH, ésta parece producirse de manera constitutiva en las células de *E. coli* bajo las condiciones del experimento. Podría pensarse que es la BADH de *E. coli* la que se expresa, pero si este fuera el caso, la bacteria no tendría por qué expresarla como cuerpos de inclusión. Además, *E. coli* expresa su BADH cuando está sometida a condiciones estresantes como frío o hipersalinidad o en presencia de colina (Falkeberg & Strom, 1990), y no existieron tales condiciones durante el experimento.

Consistente con la aparición de la mayoría de la proteína en el precipitado como cuerpos de inclusión, no se pudo detectar actividad AhyBADH ni en el extracto libre de células total ni en el sobrenadante o precipitado obtenidos después de centrifugar el extracto total a 2000g.

La razón por la cual la proteína no se pliega correctamente y se agrega formando cuerpos de inclusión no está clara para nosotros aún. Se consideró la posibilidad de que el inserto del gen tuviese el marco de lectura alterado, ya fuese por supresión de una o dos bases, o porque se hubiese insertado en la dirección equivocada. Pero si alguna de estas dos situaciones estuviese ocurriendo no se produciría un polipéptido del tamaño esperado por la secuencia del gen, como el

Resultados y discusión

que se observa en los cuerpos de inclusión, porque aparecerían señales de parada de la transcripción en la zona codificante. A pesar de ello, para estar más seguros, se comprobó, mediante un análisis de restricción como se describió en ‘Materiales y métodos’, si el gen *ahybadh* clonado en el sitio *Bam*HI del vector pBKS se encontraba en la orientación de 5’ a 3’ o en la orientación contraria de 3’ a 5’ con respecto al vector.

Se determinó la orientación del gen *ahybadh* en el vector pBKS-*ahybadh* liberando fragmentos de éste con las enzimas de restricción *Sac*I y *Sal*I, de las cuales la construcción tenía sitios internos (*Sac*I 212 y *Sal*I 992) y externos (*Sac*I 657 y *Sal*I 738) al gen *ahybadh*. Los dos escenarios posibles producirían fragmentos de tamaños muy diferentes (Figura 3 y Tabla 1), por lo tanto la distinción entre una orientación o la otra resultó sencilla.

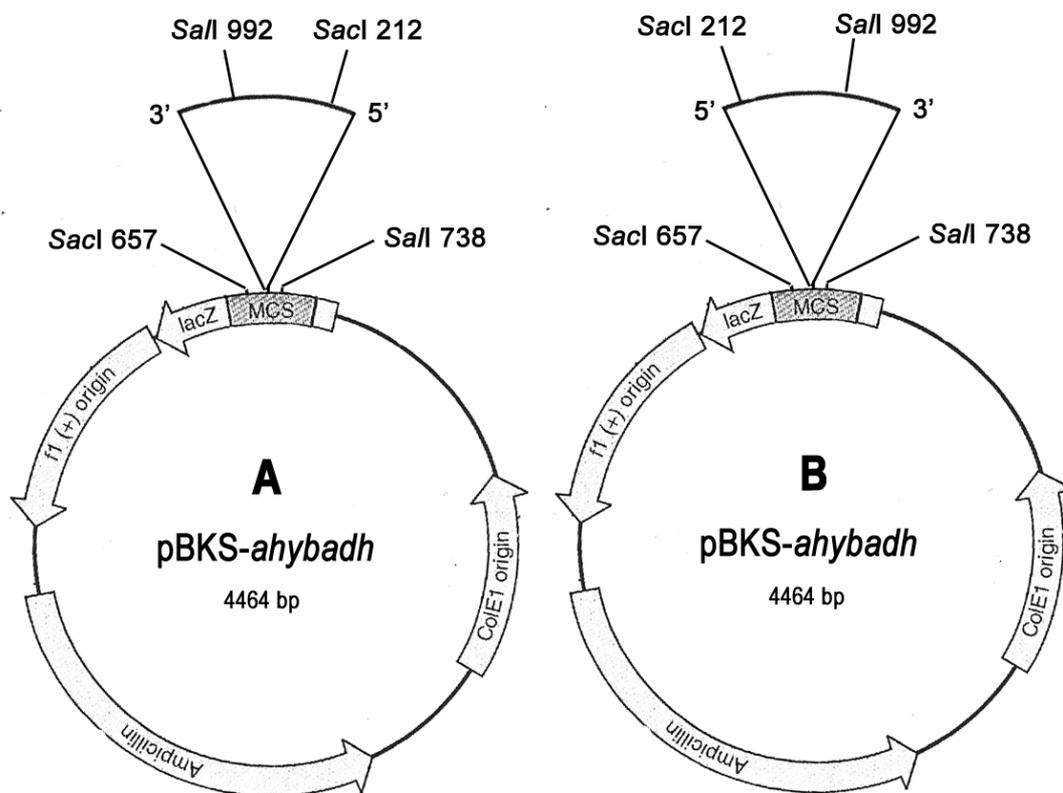


Figura 3. Posibles orientaciones del gen *ahybadh* en pBKS-*ahybadh*. El gen *ahybadh* está orientado en el mismo sentido 5’ a 3’ (A) o en contrasentido de 3’ a 5’ (B) con respecto al vector.

Resultados y discusión

En la Tabla 1 se muestra el tamaño de los fragmentos del vector con el inserto que se obtendrían por digestión con las dos enzimas seleccionadas.

Tabla 1. Tamaños hipotéticos de los fragmentos que se obtendrían en el análisis de restricción de pBKS-*ahybadh* con *SacI* y *SalI*.

Orientación del gen	Longitud de los fragmentos producidos con <i>SacI</i> (bp)	Longitud de los fragmentos producidos con <i>SalI</i> (bp)
5' a 3'	1328	1036
	3136	3438
3' a 5'	249	555
	4215	4109

En el caso de que el gen esté en la orientación de 3' a 5', es de esperarse que no se observen todos los productos del análisis de restricción en un gel de agarosa al 1.2% m/v, pues sólo aparecería una banda correspondiente al fragmento mayor para cada enzima. Por lo tanto, si se observasen dos bandas podría decirse que el gen *ahybadh* está orientado en la dirección 5' a 3', aunque obviamente también debe considerarse el tamaño de los fragmentos obtenidos.

Después de correr el gel de agarosa y revelarlo se observaron dos bandas para cada enzima. Para *SalI* se observaron bandas en aproximadamente 3.5 kb y 1.0 kb, mientras que para *SacI* se observaron bandas alrededor de 3.1 kb y 1.3 kb (Figura 4), lo que claramente mostró que el gen *ahybadh* está insertado en el vector en la orientación correcta de 5' a 3'.

Resultados y discusión

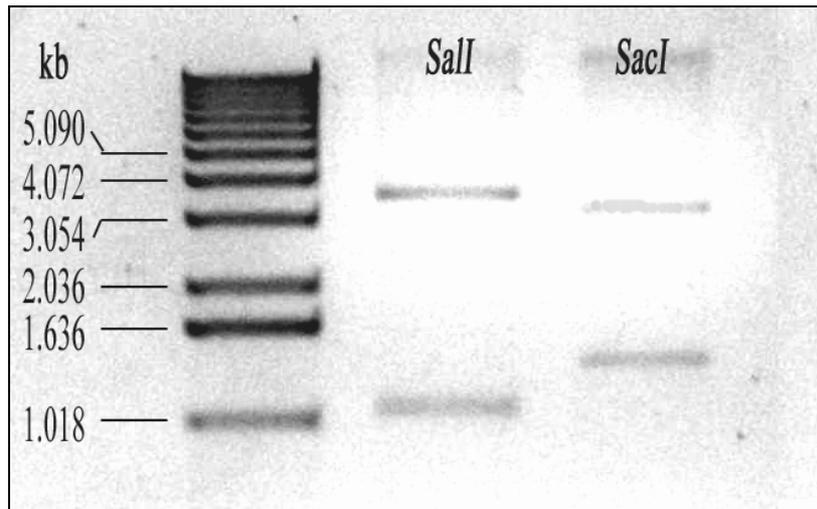


Figura 4. Gel de agarosa mostrando los productos de la digestión de pBKS-ahybadh.

Por otra parte, la traducción de la secuencia de nucleótidos del gen *ahybadh* en la dirección 5' a 3' —para lo cual se utilizó una herramienta del servidor ExPASy (www.expasy.org/tools/dna.html)— suponiendo que se hubieran suprimido una o dos bases en el gen al insertarse al vector, mostró que de haber habido estas supresiones se habrían producido polipéptidos de 84 y 11 residuos de aminoácidos, respectivamente (Figura 5). Sin embargo la proteína en los cuerpos de inclusión posee el tamaño esperado para la expresión del gen completo.

Por lo tanto, se descartó esta posibilidad y puede decirse que la proteína AhyBADH es producida en *E. coli* en forma completa, pero en una forma inactiva, mal plegada, agregada e insoluble, como cuerpos de inclusión.

También se pensó que el péptido señal fuera el responsable de la producción de la proteína como cuerpos de inclusión, pero la BADH de espinaca se expresó soluble y activa con la secuencia correspondiente al péptido señal clonada y sin ella (Incharoensakdi *et al.*, 2000).

Resultados y discusión

1^{er} marco de lectura de 5' a 3' (501 residuos)

Met AIRVPSRQLFIDGEWREPIKKNRIPINPSTEEIIGVIPAAATAEDVELA
VAAARRALKRNKGEDWASASGAHRAKYLRAIAAKITEKKDYFAKLEA
Met DCGKPLDEAAWDIDDVAGCFEYYADQAEALDAKQKAPIALP Met DT
FKCHVLKQPIGVVGLISPNYPLL Met ATWKVAPALAAAGCSAVLKPSEL
ASVTCLELAEVCREVGLPPGVNLITGLGPEAGGPLACHPDVDKVAFTG
STATGSKVMet SSAAQLVKPVTLELGGKSPIVIFEDVDLDKAAEWTAFGC
FWTNGQICSATSRLLVHESIAAEFLDRLVKWCKNIKISDPFEEGCRLLP
VVSQSQYKVLKFISTAKSEGATILCGGSRPEHLKKGYYVEPTIISDVST
SMet QIWREEVFGPVLCKVTFGSEDEAIELANDTQYGLGAAVLSKDLDR
CERITKALQAGIVWVNCSPFCFCQAPWGGTKRSGFGRELGEWGIENYL
NIKQVTEYISDEPWGWYKSP Stop

2^{do} marco de lectura de 5' a 3' (84 residuos)

WRSVYLRASYSLMet ENGGNPSRKIASLSSILLRSLVLFRLLLLK Met W
SLQSLQLEERLRGTKEKIGRLHLELIVLSTFGPLLLK Stop QRKKIILQNLK
PWIVGNHW Met KQHGTLMet Met LLDVNLIMet PIKQKPLMet LNKRLQLPFL
WTLSNAMet CLNNPLVLLG Stop FLLGIIRF Stop WQHGKLLQLLLLVAQLYL
SRLNWHF Stop LA Stop NWLKAEKWDCLLAY Stop IF Stop QD Stop VLKLVGR
Stop LA ILMet LTRLHLLGVQLLVARLCHPLLNWSSLLH Stop NLEGKVL LLS
LKMet LTWIKLLNGLLLAVFGQMet VKFAVQHRDYLCMet KASQLNFWIGL
Stop NGAKT Stop RSLTRLRKAVDLVLL Stop VRVSMet KKF Stop SSFQQQRVR
VQLFCVEVPVPSI Stop RKGIMet LNQQL Stop VMet SPLPCKYGGKKSFAQSY
VSKPLVLKMet KPLNWLMet ILSMet V Stop GLLCYRKILIGVRE Stop QRHCKL
ELCGLTAHNHAFAKLHGARSVAVLDVNSGNGVSRIT Stop ISNK Stop LNI
FPMet NHGDGTSLL

3^{er} marco de lectura de 5' a 3' (11 residuos)

GDPCTFAPAIH Stop WRMet EGT HQEKSHPHYHQSIFY Stop GDHWCYSGCYC
Stop RCGACSRCS Stop KSA Stop EEQRRLGVCIWSSSC Stop VPSGHCC Stop N
NREKRLFCKT Stop SHGLWETTG Stop SS Met GH Stop Stop CCW Met F Stop ILCRS
SRSP Stop C Stop TKGSNCPSYGHFQ Met PCA Stop TTHWCCWVDFSLELSASN
GNMet ESCSSSCWLLSCT Stop AV Stop TGIRNLPRIG Stop SVQRSGTASWRI
KYFNRI RS Stop S W W AVSLPS Stop C Stop QGCIYWEYSYW Stop QGYVIRCSIG
QACYIRTWREKSYCYL Stop RC Stop LG Stop SC Stop Met DCFWLF LDKWSNLQ
CNIEITCA Stop KHRS Stop IFG Stop ACK Met VQKHKDL Stop PV Stop GRLSTWSC
CE Stop ESV Stop KSFEVHFNSKE Stop GCNYFVWRFPSRAFEERVLC Stop TNN
YK Stop CLHFHAN Met EGRSFRPSL Met CQNLWF Stop R Stop SH Stop TG Stop Stop
YSVWFRGCCVIERS Stop SV Stop ENNKGIASWNCVG Stop LLTT Met LLPS S
Met GRHEA Stop RFWT Stop TRG Met GYRELLEYQTSD Stop IYFR Stop T Met G Met
VQVSL

Figura 5. Polipéptidos que se producirían si ocurriese un cambio de marco de lectura por supresión de una o dos bases en la secuencia nucleotídica del gen *ahybadh*.

Otra posibilidad que pudiera dar lugar a la formación de cuerpos de inclusión es que la proteína se oxide parcialmente durante su síntesis y que esta oxidación impida su plegamiento correcto. Si bien el medio intracelular de *E. coli*

Resultados y discusión

es reductor, hay que considerar que la AhyBADH contiene un número anormalmente elevado de cisteínas por subunidad (16), una de las cuales es la catalítica. Aunque muchas de estas cisteínas no están expuestas al solvente una vez que la proteína se ha plegado, es de esperar que todas ellas lo estén transitoriamente durante el proceso de plegamiento, y por tanto sean susceptibles de oxidación, lo que puede llevar a la formación de puentes disulfuro intra o intercadena polipeptídica y a la formación de agregados de alta masa molecular conteniendo proteína mal plegada. La única otra BADH vegetal que a la fecha se ha expresado en forma soluble y activa en *E. coli* es la de hoja de espinaca (Incharoensakdi *et al.*, 2000), una enzima que tiene un grado de identidad del 84% con la AhyBADH. Resulta interesante que la enzima de espinaca posee 11 cisteínas, es decir, 5 cisteínas menos por subunidad que la AhyBADH. Se alinearon las secuencias de ambas enzimas (Figura 6) para identificar a las cisteínas que están presentes en la enzima de amaranto y que no se encuentran en la enzima de espinaca. Se localizaron éstas en un modelo de la estructura tridimensional de la AHyBADH (Figura 7), obtenido a partir de su secuencia de aminoácidos usando el servidor de Swissprot (<http://expasy.org/sprot/>, <http://www.expasy.org/tools/sim-prot.html>), usando como patrón la estructura tridimensional de la BADH de hígado de bacalao (Johansson *et al.*, 1998) con la que las enzimas de amaranto y espinaca poseen una identidad del 39% y el 40%, respectivamente. A pesar de esta relativamente baja identidad, el alto grado de conservación de la estructura tridimensional en la superfamilia de las ALDHs, constatado en las estructuras ya determinadas de enzimas de diferentes orígenes y que exhiben entre ellas bajo grado de identidad a nivel de secuencia de aminoácidos (Steinmetz *et al.*, 1997; Moore *et al.*, 1998; Cobessi *et al.*, 1999; Lamb & Newcomer, 1999; Ahvazi *et al.*, 2000), permite

Resultados y discusión

predecir que el modelo obtenido debe ser cercano a la estructura real, al menos en sus características más generales.

BADH_AMAHP	1	MAIRVPSRQLFIDGEWREPIKKNRIPINPSTEEIIGDIPAATAEDVELAVAAARRALKR
BADH_SPIOL	1	MAFP I PARQLFIDGEWREPIKKNRIPVINPSTEEIIGDIPAATAEDVEVAVVAARRAFRR
		** * ***** ** ***** *
BADH_AMAHP	61	NKGEDWASASGAHRAKYLRAIAAKITEKKDYFAKLEAMDGKPLDEAARDIDDVAGCFEY
BADH_SPIOL	61	N--NWSATSGAHRATYLRRAIAAKITEKKDHFVKLETIDSGKPFDEAVLDIDDVASC FEY
		* * ***** * ** * ** * ** * ** * ** *
BADH_AMAHP	121	YADQAEALDAKQKAPIALPMDTFKCHV LKQPIGVVGLISPWNYPLL MATWKPALAAAGC
BADH_SPIOL	118	FAGQAEALDGKQKAPVTLPMERFKSHVLRQPLGVVGLISPWNYPLL MATWKIAPALAAAGC
		* ***** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *
BADH_AMAHP	181	SAVLKPSELASVTCLELAEVCREVGLPPGVNLILTGLGPEAGGPLACHPDVKVAFTGST
BADH_SPIOL	178	TAVLKPSELASVTCLEFGEVNEVGLPPGVNLILTGLGPDAGAPLVHPDVKIAFTGSS
		***** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *
BADH_AMAHP	241	ATGSKVMSSAAQLVKPVTLELGGKSPIVIFEDVDLKAAEWTAFCFWTNGQIC SATSRL
BADH_SPIOL	238	ATGSKVMASAAQLVKPVTLELGGKSPIVVFEDVDIDKVVWETIFGCFWTNGQIC SATSRL
		***** ***** ** * ** * ** * ** * ** * ** *
BADH_AMAHP	301	LVHESIAAEFLDRLVKWCKNLIKISDPFEEGCRLGPVVSQSQYEVKLFISTAKSEGATIL
BADH_SPIOL	298	LVHESIAAEFVDKLVKWKCNLIKISDPFEEGCRLGPVLSKQYDKIMKFISTAKSEGATIL
		***** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *
BADH_AMAHP	361	CGGSRPEHLKKGYYVEPTIISDVSTSMQIWREEVFGPVLCKTTFGSEDEAIELANDTQYG
BADH_SPIOL	358	YGGSRPEHLKKGYYIEPTIVTDISTSMQIWKEEVFGPVLCKVTFSSSEDAIALANDTEYG
		***** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *
BADH_AMAHP	421	LGAAVLSKDLDR CERITKALEVGAVVNC SQPCFTQAPWGGTKRSGFGRELGEWGIENYL
BADH_SPIOL	418	LAAAVFSNDLER CERITKALEVGAVVNC SQPCFVQAPWGGIKRSGFGRELGEWGIQNYL
		* ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *
BADH_AMAHP	481	NIKQVTRDTSTDEPWGWYKSP
BADH_SPIOL	478	NIKQVTQDIS-DEPWGWYKSP
		***** * ** * ** * ** *

Figura 6. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las BADHs de hoja de amaranto y de espinaca. En verde se indican las cisteínas comunes a las dos enzimas, en rojo se marcan las cisteínas exclusivas de la AhyBADH.

Interesantemente, dos de las cinco cisteínas exclusivas de la AhyBADH están en o cercanas al dominio de oligomerización y otras dos, aunque en la superficie, están lo suficientemente próximas y en la orientación correcta como para formar un puente disulfuro, según predice el modelo. Sin embargo, la proteína obtenida de la hoja no posee ningún puente disulfuro; todas sus cisteínas están reducidas (Mújica-Jiménez & Muñoz-Clares, datos sin publicar). Creemos por

Resultados y discusión

tanto que la formación de puentes disulfuro incorrectos es una posibilidad que merece explorarse en estudios posteriores, determinando mediante electroforesis no reductoras en geles de poliacrilamida si la proteína contenida en los cuerpos de inclusión posee o no puentes disulfuro.

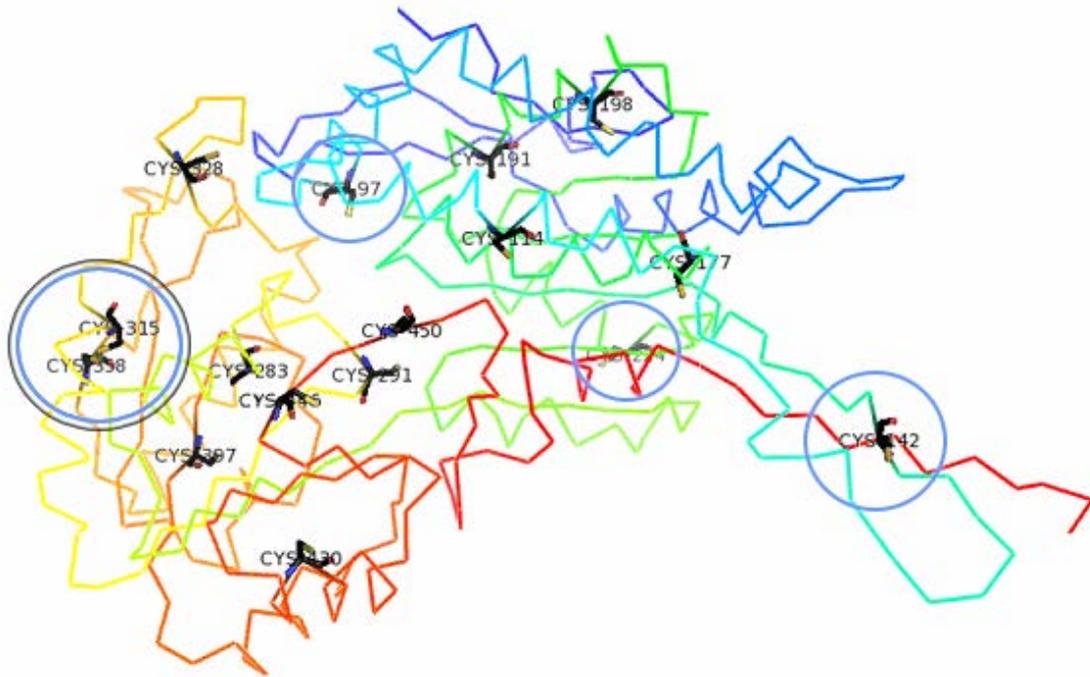


Figura 7. Posición de los residuos de cisteína en el modelo tridimensional de la AhyBADH. Las cisteínas presentes en la AhyBADH que no están en la BADH de espínaca están encerradas en un círculo azul. El puente disulfuro que el modelo predice se marca con un círculo negro. La figura fue creada con el programa PyMol (DeLano, 2002).

5.2. Solubilización y repliegue de los cuerpos de inclusión

Para intentar obtener proteína nativa a partir de los cuerpos de inclusión, se trató en primer lugar de solubilizarlos mediante la incubación de éstos con urea 6 M durante 24 horas a 4 °C. Los patrones electroforéticos del precipitado y sobrenadante del extracto libre de células y de los cuerpos de inclusión después de la incubación con urea 6 M (Figura 8) muestran que la banda gruesa en el

Resultados y discusión

precipitado que corresponde a la masa molar de la AhyBADH se distribuye entre el precipitado y el sobrenadante después de la incubación con urea. La urea por tanto, bajo las condiciones de este experimento, produjo una solubilización parcial de la AhyBADH.

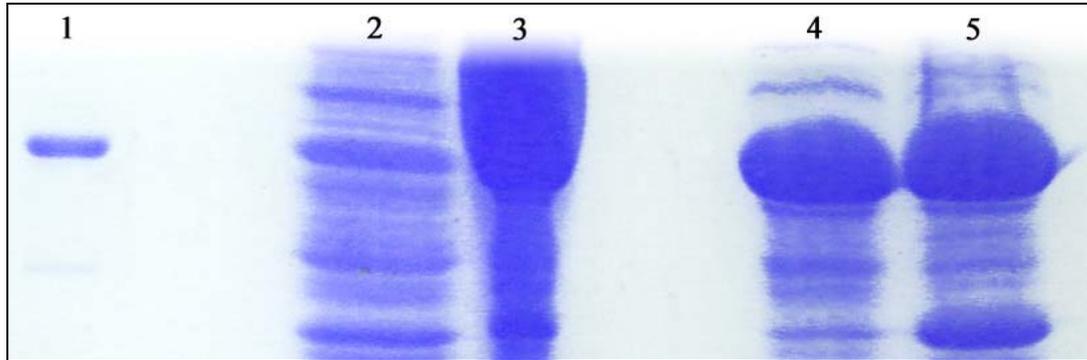


Figura 8. SDS-PAGE de los extractos libres de células de *E. coli* transformadas con el plásmido pBKS-*ahybadh*. Carriles: 1) BADH purificada de hojas de amaranto; 2) sobrenadante y 3) precipitado del extracto libre de células; 4) sobrenadante y 5) precipitado de los cuerpos de inclusión tras 24 horas de incubación con urea 6 M a 4 °C.

Sin embargo, la proteína obtenida en el sobrenadante después del tratamiento de los cuerpos de inclusión con urea no está lo pura que se requiere para tratar de renaturalizarla *in vitro*. En un intento de eliminar a las proteínas contaminantes se hicieron varios lavados de los cuerpos de inclusión antes de la incubación con urea 6 M, como se describe en ‘Materiales y métodos’.

Resultados y discusión

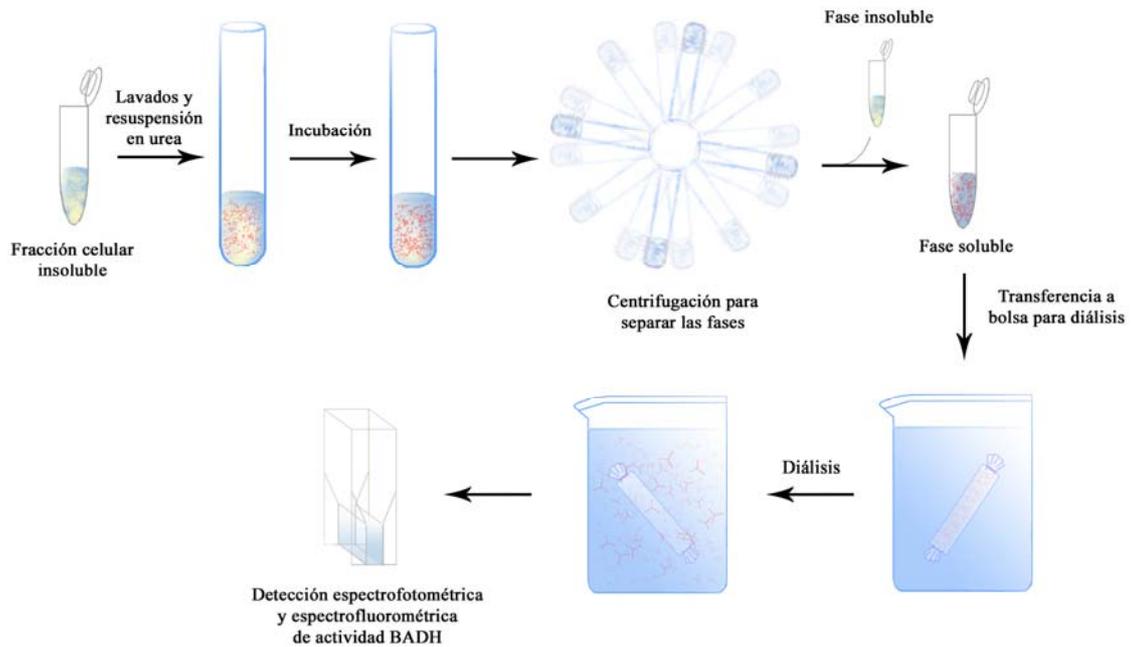


Figura 9. Solubilización de los cuerpos de inclusión.

La SDS-PAGE correspondiente al lavado y solubilización de los cuerpos de inclusión con urea 8 M (Figura 10) mostró que mediante los lavados se pudo eliminar una gran cantidad de las proteínas contaminantes. Tras la diálisis para eliminar la urea, se intentó detectar la actividad de la AhyBADH por medio de ensayos espectrofotométricos y espectrofluorométricos, bastante más sensibles que los anteriores, pero no se encontró actividad alguna, lo que indica que aunque se logró solubilizar la proteína, ésta no se replegó a su estructura nativa.

Resultados y discusión

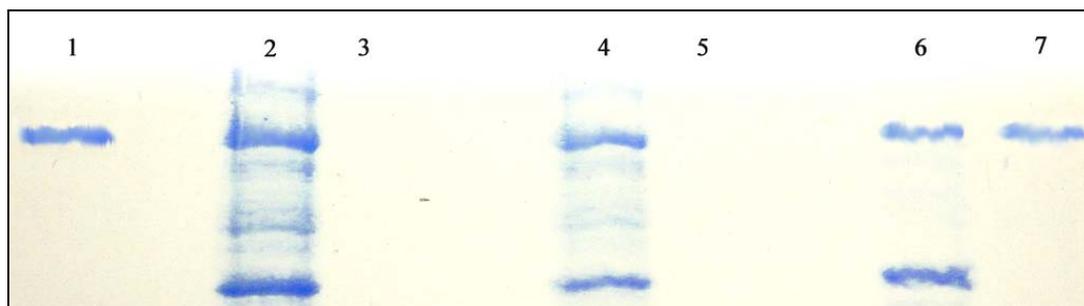


Figura 10. SDS-PAGE del lavado y solubilización de los cuerpos de inclusión.

Carriles: 1) AhyBADH purificada de hojas; 2) precipitado y 3) sobrenadante de los cuerpos de inclusión tras el primer lavado; 4) precipitado y 5) sobrenadante de los cuerpos de inclusión tras 3 lavados; 6) precipitado y 7) sobrenadante de los cuerpos de inclusión tras 3 lavados después de 2 horas de incubación con urea 8 M a 30 °C .

La determinación de la proteína soluble total por el método de Bradford se hizo por duplicado, y se obtuvieron 3.52 ± 0.10 mg de proteína/mL de extracto. Por tanto, sería posible de una forma fácil obtener cantidades de proteína pura inactiva a partir de los cuerpos de inclusión que podría usarse para estudios que no la requieran plegada como la obtención de anticuerpos específicos.

5.3. Transformación de células de *E. coli* previamente transformadas con pBKS-*ahybadh* con vectores que contienen chaperonas de *P. aeruginosa*

Para intentar resolver el problema de la obtención de la proteína como cuerpos de inclusión, se intentó incorporar a las células de *E. coli* previamente transformadas con pBKS-*ahybadh* vectores conteniendo los genes de una o tres chaperonas de *P. aeruginosa* para que una vez expresadas ayudaran a la AhyBADH a plegarse. Sin embargo, en forma inesperada encontramos que las células de *E. coli* previamente transformadas con pBKS-*ahybadh* y posteriormente

Resultados y discusión

transformadas con los vectores que contenían sólo una chaperona no crecían en medio sólido selectivo.

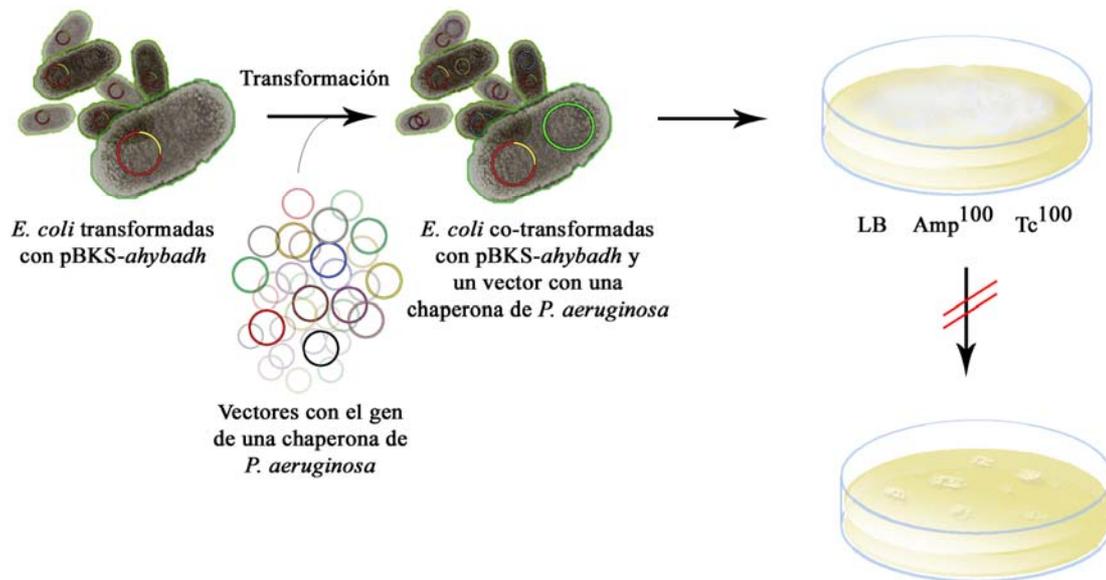


Figura 11. Diagrama de la co-transformación de células de *E. coli* con pBKS-ahybadh y un vector con una chaperona.

En cambio, las células transformadas con la mezcla de vectores que contenían 3 chaperonas crecieron exacerbadamente en presencia de los dos antibióticos. Puesto que existía la posibilidad de que se hubieran extendido todas las células transformadas en una misma caja, y principalmente debido a que el crecimiento bacteriano fue excesivo, en un siguiente experimento la cantidad usada de la suspensión de células transformadas para extender en las cajas con medio sólido selectivo con ambos antibióticos (ampicilina y tetraciclina) se redujo de 200 a 50 μ L. Aun así, el crecimiento bacteriano fue masivo, por lo que se decidió sembrar un gran número de colonias al azar para aumentar la probabilidad de encontrar alguna en la que se expresara un grupo de chaperonas que ayudara a la AhyBADH a plegarse en su forma nativa. Al final se contó con 15 cajas con un

Resultados y discusión

promedio de 20 colonias cada una, *i.e.* 300 colonias que podrían ser diferentes y en las que esperábamos encontrar AhyBADH sobreexpresada en forma activa por la acción de una o más chaperonas de *P. aeruginosa* (Figura 12).

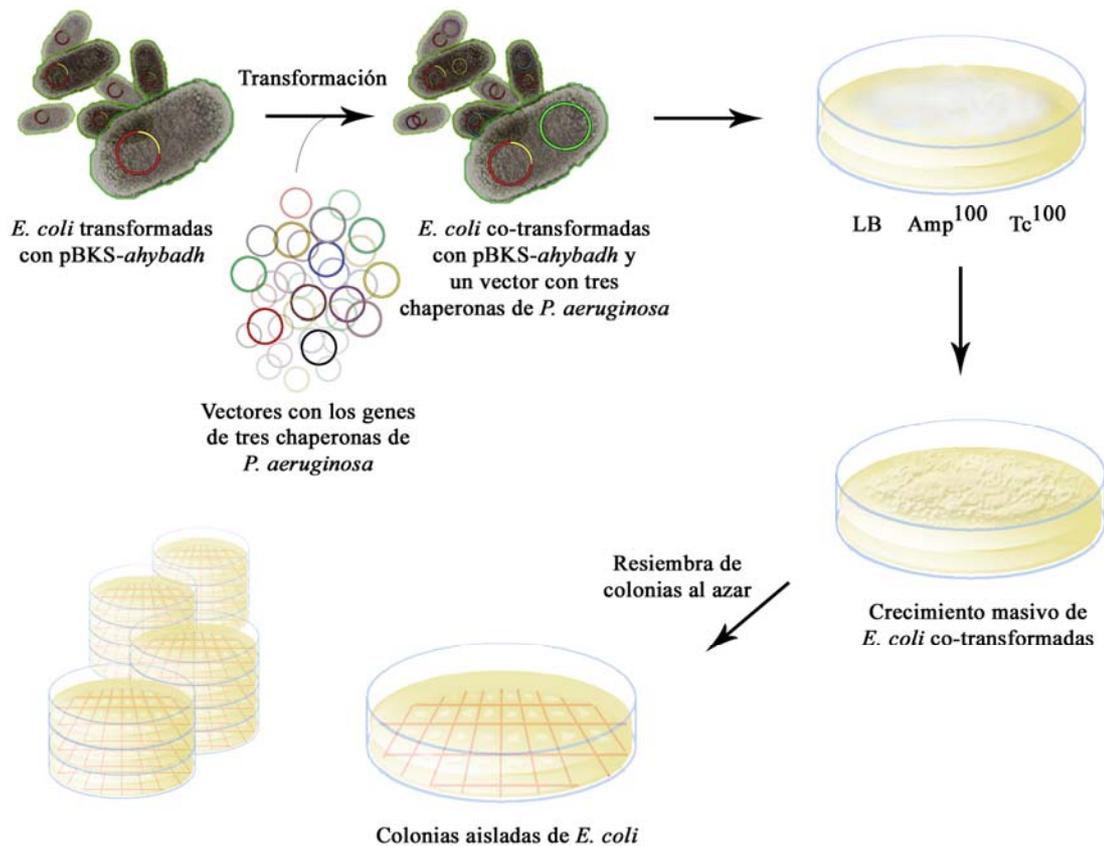


Figura 12. Diagrama de la co-transformación de células de *E. coli* con pBKS-ahybadh y un vector con tres chaperonas.

5.4. Sobreexpresión de la AhyBADH en células de *E. coli* transformadas con pBKS-ahybadh y un vector con tres chaperonas de *P. aeruginosa*

La estrategia general para encontrar un sistema en el que se expresara la AhyBADH era la siguiente: se probarían todas las colonias hasta que se encontrara

Resultados y discusión

una que presentara actividad BADH, de la cual se obtendría su DNA para identificar las chaperonas que ayudaron a que la AhyBADH se plegara en forma nativa. Una vez identificadas estas chaperonas, se transformarían células previamente transformadas con pBKS-*ahybadh* con los vectores que contienen cada una de las chaperonas por separado. Finalmente se probarían los extractos de cada colonia de células transformadas para verificar si la chaperona puede actuar sola o si es necesaria la sobreexpresión del complejo de chaperonas para la producción de AhyBADH activa.

Se realizó la inducción, extracción y detección de actividad de la enzima en todas las colonias (Figura 13), pero no se encontró extracto alguno que presentara actividad AhyBADH.

Resultados y discusión

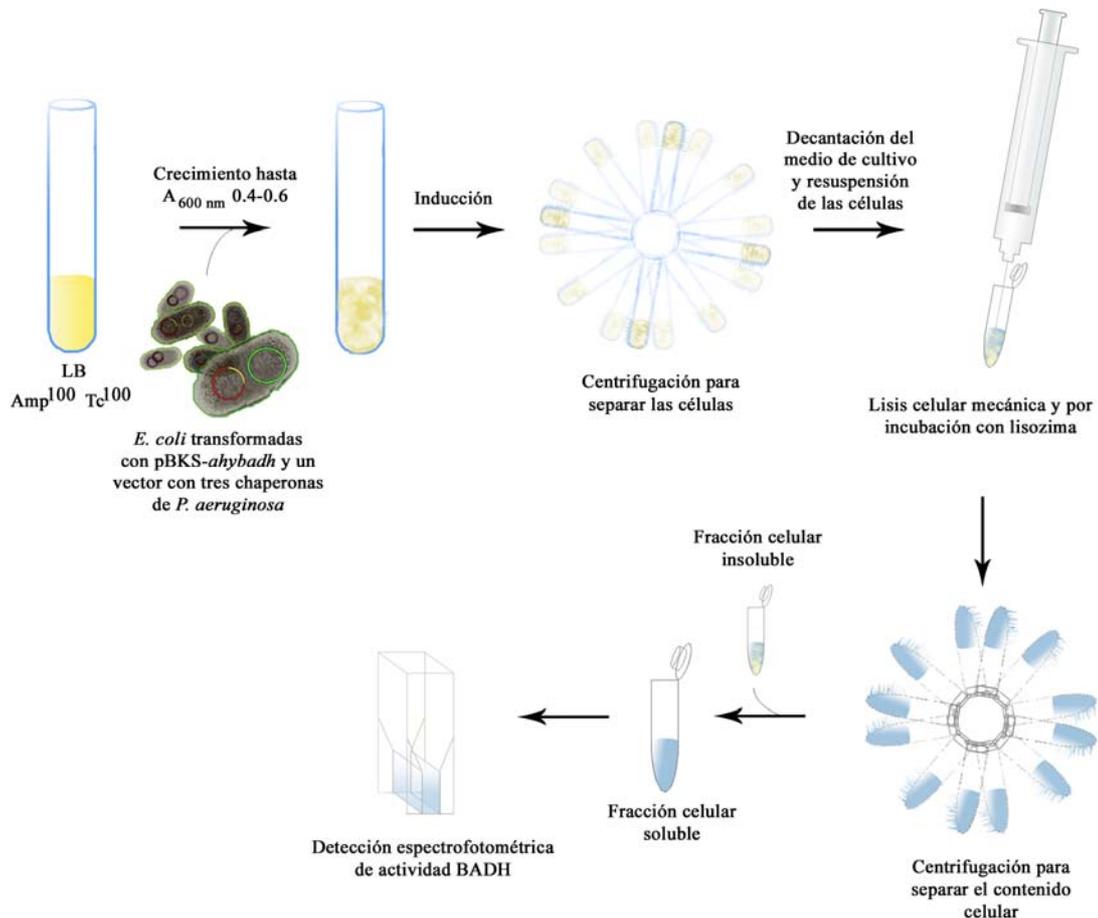


Figura 13. Diagrama de la extracción del contenido intracelular de células de *E. coli* transformadas con pBKS-*ahybadh* y un vector con 3 chaperonas de *P. aeruginosa*.

Se pensó que tal vez la lisis celular no se estaba haciendo de manera adecuada y que se requeriría sonicar para asegurar la completa ruptura celular. Se había evitado la sonicación debido a que generaría mucho calor en el volumen de resuspensión tan pequeño con el que se debió trabajar debido a la gran cantidad de extractos libres de células que se tenían que obtener. Sin embargo esta suposición se descartó completamente después de hacer una SDS-PAGE que mostraba en el gel que tanto en la fracción soluble como en la insoluble del extracto libre de células había proteínas, lo cual quiere decir que sí se estaban rompiendo las células como lo muestra el gel (Figura 14).

Resultados y discusión

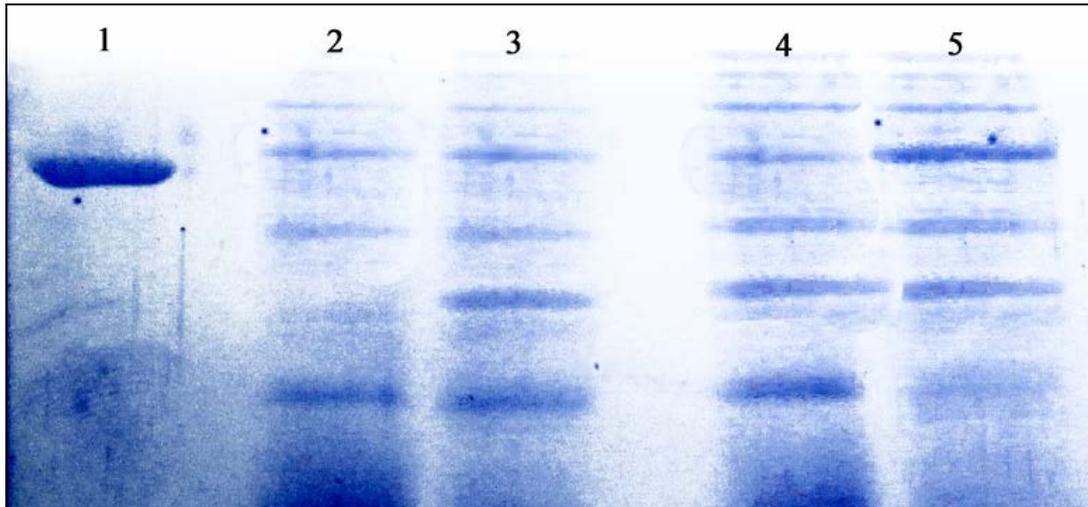


Figura 14. SDS-PAGE de la co-expresión de la AhyBADH y chaperonas de *P. aeruginosa*. Carriles: 1) AhyBADH purificada de hojas; 2) sobrenadante y 3) precipitado del extracto libre de células co-transformadas con pBKS-*ahybadh* y un vector con chaperonas de *P. aeruginosa* sin inducción con IPTG; 4) sobrenadante y 5) precipitado del extracto libre de células co-transformadas con *ahybadh* y un vector con chaperonas de *P. aeruginosa* inducidas con IPTG.

En este gel de poliacrilamida puede verse que la AhyBADH no fue producida ni en la fase insoluble como cuerpos de inclusión, aun cuando las células aceptaron el plásmido que contenía 3 genes estructurales que codifican para chaperonas de *P. aeruginosa*.

Es probable que las chaperonas de *P. aeruginosa* no ayuden al pliegue de proteínas eucarióticas o a la solubilización de agregados proteicos en *E. coli* en las condiciones de estos experimentos.

5.5. Inserción del gen *ahybadh* en pRS6 a partir de pBKS-*ahybadh*

Para resolver el problema de la producción de la AhyBADH como cuerpos de inclusión en células procarióticas, se decidió cambiar de un microorganismo sobreproductor procariótico a uno eucariótico, la levadura *S. cerevisiae*. Para este

Resultados y discusión

fin, fue necesario liberar el gen *ahybadh* del vector pBKS-*ahybadh* que se había usado para la expresión en *E. coli*, para su posterior inserción en el vector de expresión pRS6 para levadura (Mascorro-Gallardo, 2000).

Para liberar el gen *ahybadh* se seleccionaron las enzimas de restricción *XhoI* y *NotI* que tienen sitios de corte externos al gen en pBKS-*ahybadh*. Idealmente, la liberación del inserto se debería hacer por pasos para lograr una mayor eficiencia, *i.e.* primero cortar con una enzima de restricción y luego con la otra para asegurar un corte eficiente. Sin embargo, el proceso de purificación del DNA después del primer corte, hecho con *XhoI*, no permitía que el corte con *NotI* se llevara a cabo. Probablemente alguno de los reactivos del kit purificador inhibía la actividad de *NotI*. Después de varios intentos de hacer el corte secuencialmente, se decidió utilizar ambas enzimas a la vez usando el amortiguador de *NotI*. Se utilizó el doble de la cantidad normal de *XhoI* para compensar su posible falta de actividad en un amortiguador ajeno. Se alargó el tiempo de la digestión, toda la noche en lugar de sólo un par de horas, para permitir a las enzimas digerir adecuadamente el vector. Un gel de agarosa de los productos de la digestión (Figura 15) mostró que finalmente se había logrado liberar el fragmento correspondiente al gen *ahybadh* de pBKS-*ahybadh*.

Resultados y discusión

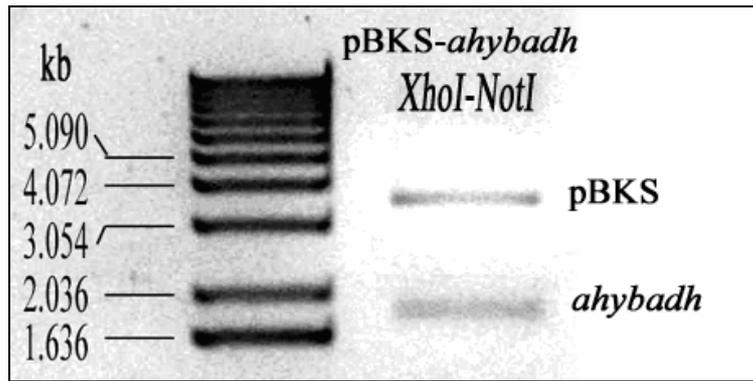


Figura 15. Gel de agarosa mostrando los productos de la digestión simultánea de pBKS-ahybadh con XhoI y NotI.

Se cortó el vector pRS6 de igual manera que como se liberó el gen *ahybadh* de pBKS-ahybadh y se corrieron los productos de ambas digestiones en un gel de agarosa para determinar sus concentraciones relativas, que se observaron eran prácticamente iguales (Figura 16). Teniendo esto en cuenta, se dejaron ligando durante toda la noche en una proporción 1:3 (vector:inserto).

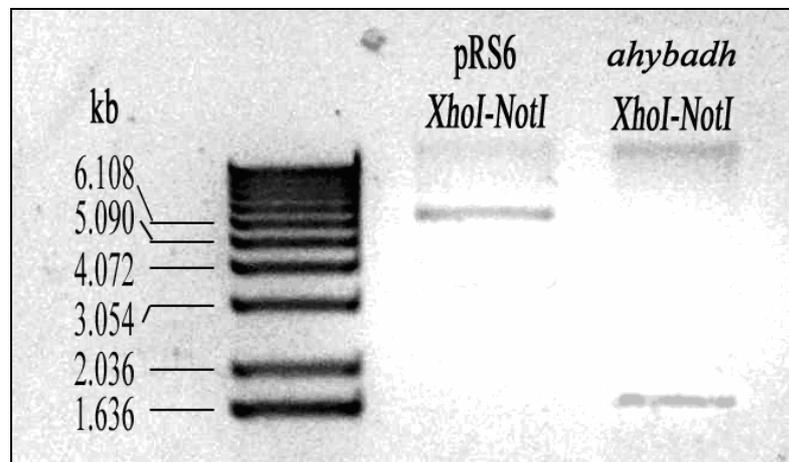


Figura 16. Gel de agarosa usado de la determinación de las concentraciones relativas del vector pRS6 y el inserto *ahybadh*.

Se comprobó que la ligación fue exitosa mediante un gel de agarosa cargado con el producto de la ligación después de ser digerido con XhoI y NotI, que al ser

Resultados y discusión

revelado con luz UV (Figura 17) demostró que se tenía el gen *ahybadh*, de poco más de 1.6 kb de longitud, inserto en un vector de una longitud de ~6 kb, que corresponde a la longitud del pRS6 y que coincide con la banda de éste en el gel.

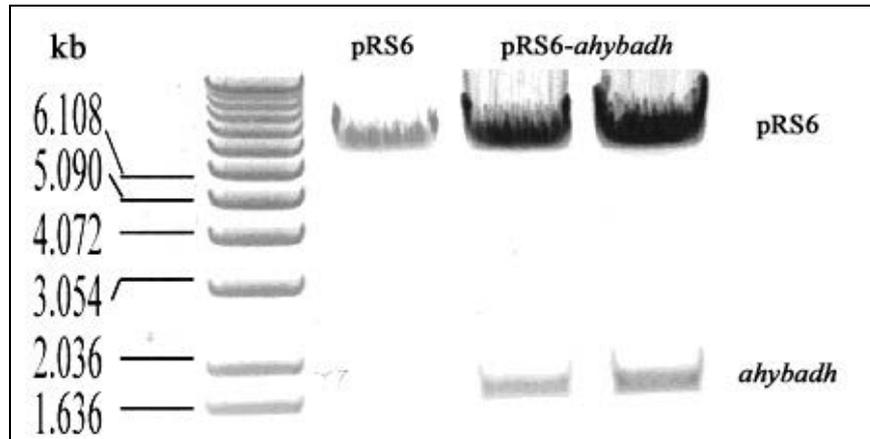


Figura 17. Gel de agarosa con el producto de la digestión con *XhoI* y *NotI* del vector pRS6-*ahybadh*.

5.6. Transformación de células de *S. cerevisiae* con pRS6-*ahybadh*

Se transformaron células competentes de *S. cerevisiae* con pRS6-*ahybadh* por el método de acetato de litio/portador de DNA de cadena sencilla/polietilén glicol como se describe en 'Materiales y métodos', y se extendieron sobre medio sólido selectivo que seleccionaría por auxotrofia a histidina (Figura 18).

Resultados y discusión

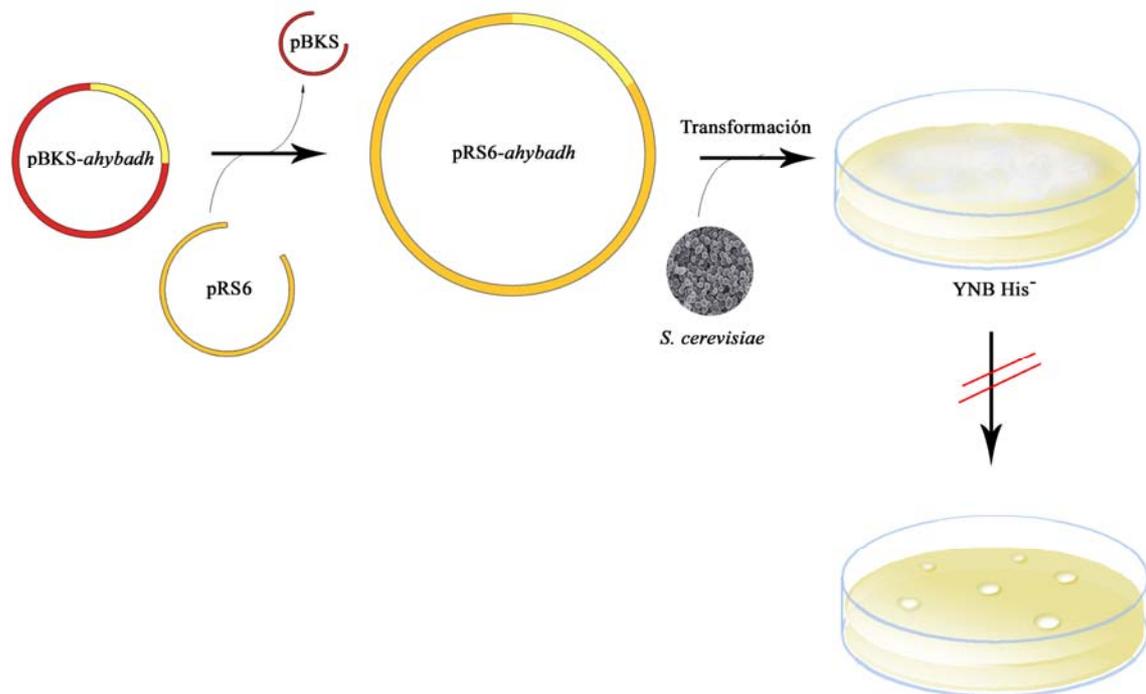


Figura 18. Diagrama de la transformación de *S. cerevisiae* con pRS6-ahybadh.

Después de dejarlas creciendo durante 2 días a 30 °C, se observó crecimiento anormal de hongos y por lo tanto se tuvo que volver a hacer la transformación. Se repitió la transformación muchas veces pero nunca se obtuvieron colonias de levadura, sólo se obtenían cajas vacías o con hongos diferentes a la levadura. Inicialmente se pensó que la contaminación microbiológica se debía a una mala manipulación durante el protocolo de transformación, por lo que se extremaron las precauciones, preparándose nuevos medios de cultivo, nuevos amortiguadores, y trabajando bajo condiciones de máxima esterilidad. También se emplearon otros métodos para transformar las células, como la electroporación, pero el resultado fue siempre el mismo, es decir, no obtuvimos crecimiento de colonias de levadura. La primera explicación que surgió ante la falta de crecimiento fue que la transformación no se llevó a cabo, pero después de probar varias veces con métodos distintos de efectividad comprobada se descartó esta hipótesis. También se

Resultados y discusión

pensó que, al ser pRS6 un vector con un promotor fuerte que hace a la AhyBADH una enzima constitutiva, ésta resultaba dañina para la levadura que no posee el gen de la BADH (Julián-Sánchez *et al.*, 2007). El daño podría deberse a que la actividad catalítica de esta enzima produjese alguna sustancia que fuera tóxica para la levadura, lo cual parece improbable dado que por el contrario las aldehído deshidrogenasas detoxifican aldehídos, o llevase al agotamiento de alguna sustancia esencial para la levadura. Después de muchos intentos para transformar las células de *S. cerevisiae* con pRS6-*ahybadh*, se decidió cambiar de vector de expresión a uno que permitiera la expresión inducible de la AhyBADH.

5.7. Inserción del gen *ahybadh* en pSAL3 a partir de pRS6-*ahybadh*

Se liberó el gen *ahybadh* de pRS6-*ahybadh* con *XhoI/NotI* y se ligó en el vector pSAL3. Ambos procesos se hicieron durante toda la noche para asegurar un corte y ligación completos. El procedimiento seguido fue el mismo que con el vector pRS6.

5.8. Transformación de células de *S. cerevisiae* con pSAL3-*ahybadh*

Se transformaron células competentes de *S. cerevisiae* de la cepa W303-1A con el vector pSAL3-*ahybadh* por el método de acetato de litio/portador de DNA de cadena sencilla/polietilén glicol y después de dejar creciendo en medio sólido selectivo sin uracilo y con ampicilina 100 µg/mL a 30 °C durante 2 días, se vio crecimiento de colonias (Figura 19).

Resultados y discusión

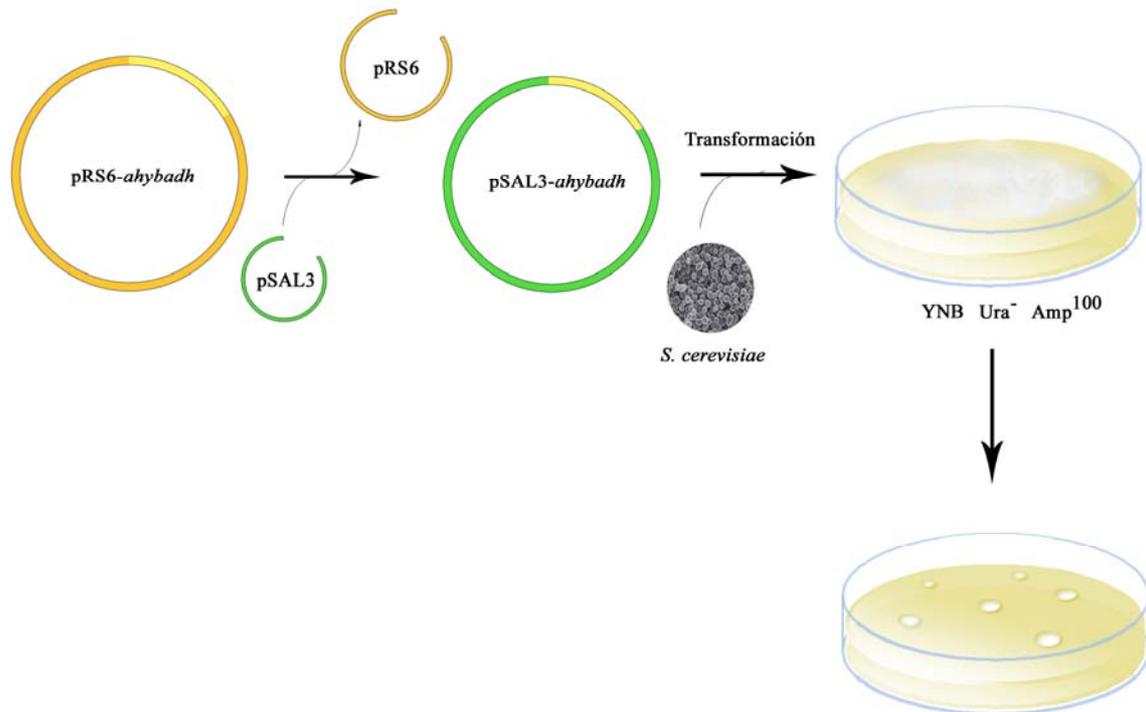


Figura 19. Diagrama de la transformación de *S. cerevisiae* con pSAL3-ahybadh.

Tras hacer mini-preparaciones de DNA para extraer el DNA plasmídico de dos de las colonias transformadas que crecieron en el medio selectivo, se realizó una electroforesis en gel de agarosa (Figura 20) que mostró la presencia de pSAL3-ahybadh en la levadura.

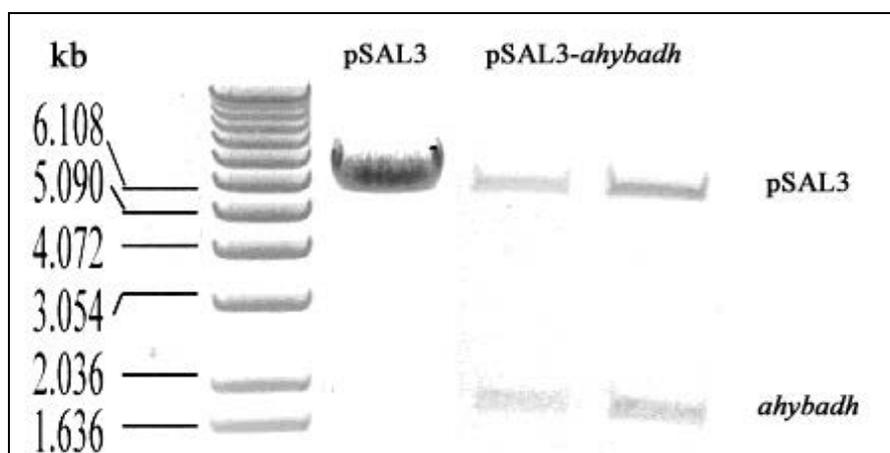


Figura 20. Gel de agarosa de la digestión con *XhoI* y *NotI* del DNA plasmídico de células de *S. cerevisiae* transformadas con pSAL3-ahybadh.

Resultados y discusión

5.9. Sobreexpresión de la AhyBADH en células de *S. cerevisiae* transformadas con pSAL3-*ahybadh*

Después de inducir la síntesis de la enzima con Cu(II), en disolución acuosa de CuSO₄, a concentraciones finales de 100, 200 y 300 μM durante 3 horas, se rompieron las células y se hicieron los ensayos espectrofotométricos de actividad BADH en el sobrenadante de los extractos libres de células obtenidos (Figura 21).

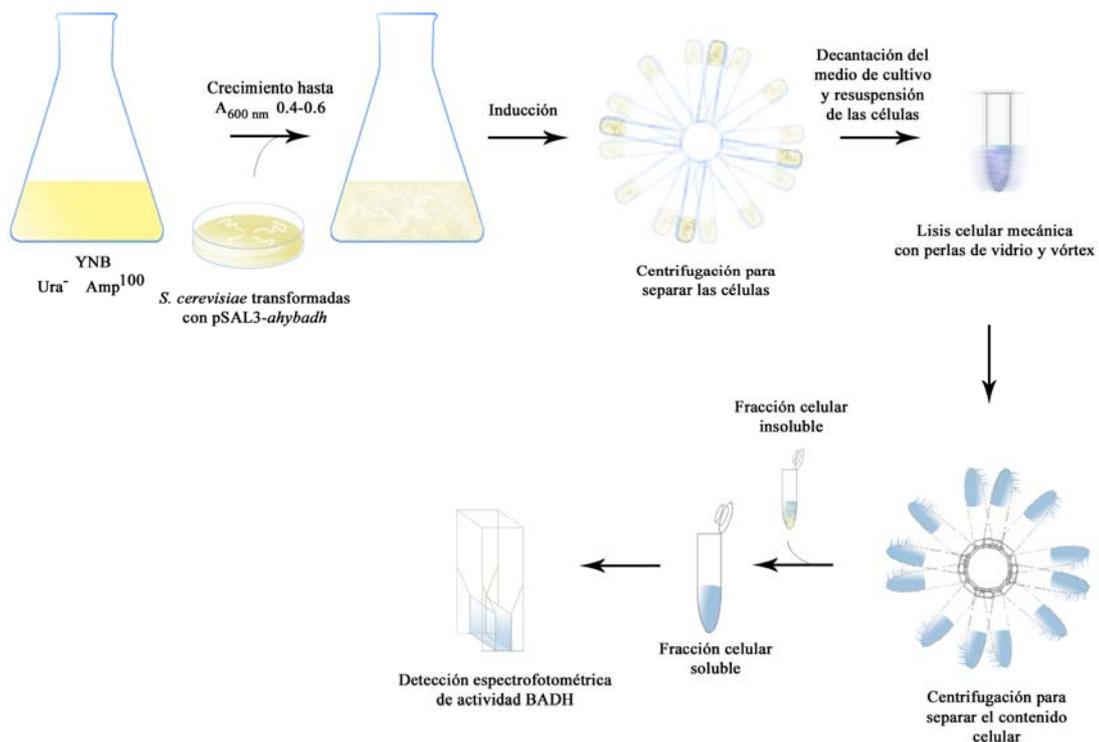


Figura 21. Diagrama de la extracción del contenido intracelular de células de *S. cerevisiae* transformadas con pSAL3-*ahybadh*.

Los sobrenadantes de los extractos libres de células de aquellas que fueron transformadas con pSAL3-*ahybadh* como de las transformadas sólo con pSAL3 mostraron una actividad deshidrogenasa que no era dependiente de betaína aldehído.

Resultados y discusión

El mismo resultado se obtuvo cuando la inducción de la AhyBADH se hizo con con concentraciones finales de Cu(II) de 25, 50 y 100 μM y tiempos de inducción de 4 y 20 horas (Tabla 2). Cuando en el medio de ensayo sólo estaba presente betaína aldehído sin la coenzima no se observó actividad.

Tabla 2. Actividad NAD^+ reductasa de los sobrenadantes de los extractos libres de células de *S. cerevisiae* transformadas con pSAL3-*ahybadh* y pSAL3, sin inducir e inducidas con Cu(II), a 4 y 20 horas de inducción.

Muestra		Actividad (4 horas de inducción)		
		Medio de ensayo		
		BA + NAD^+	NAD^+	BA
BADH purificada (referencia)		5.9120	0.0102	0.0190
pSAL3-BADH	Sin Cu^{2+}	0.0622	0.1883	<0.01
	Cu^{2+} 25 μM	0.1609	0.0853	<0.01
	Cu^{2+} 50 μM	0.0463	0.1443	<0.01
	Cu^{2+} 100 μM	0.0624	0.0366	<0.01
pSAL3	Sin Cu^{2+}	0.1162	0.2047	<0.01
	Cu^{2+} 25 μM	0.0879	0.0047	<0.01
	Cu^{2+} 50 μM	0.2301	0.1278	<0.01
	Cu^{2+} 100 μM	0.1168	0.1575	<0.01
Muestra		Actividad (20 horas de inducción)		
		Medio de ensayo		
		BA + NAD^+	NAD^+	BA
BADH purificada (referencia)		9.1219	0.0052	0.0117
pSAL3-BADH	Sin Cu^{2+}	0.3776	0.8367	<0.01
	Cu^{2+} 25 μM	0.3183	0.2981	<0.01
	Cu^{2+} 50 μM	0.1976	0.1719	<0.01
	Cu^{2+} 100 μM	0.1879	0.1836	<0.01
pSAL3	Sin Cu^{2+}	0.4781	0.3126	<0.01
	Cu^{2+} 25 μM	0.4166	0.2703	<0.01
	Cu^{2+} 50 μM	0.1294	0.1917	<0.01
	Cu^{2+} 100 μM	0.2496	0.1832	<0.01

La cantidad de proteína soluble obtenida en estas extracciones varió desde 2.92 mg/mL hasta 4.83 mg/mL, obteniéndose una mayor cantidad de proteína en las células transformadas con pSAL3, lo cual es contrario a lo que se esperaba pues de haberse inducido la síntesis de la AhyBADH, habría una mayor cantidad de proteína en las células transformadas con pSAL3-*ahybadh*.

Resultados y discusión

Con el fin de comprobar si había actividad BADH en estos extractos aunque fuese muy poca, se intentó concentrar la enzima precipitándola con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en los extractos inducidos con Cu(II) $25 \mu\text{M}$ pero no hubo una actividad NAD^+ reductasa dependiente de betaína aldehído detectable.

Los resultados indican que en realidad no se tiene la AhyBADH expresada en forma soluble y activa en cantidades apreciables, sino alguna otra enzima de la levadura que toma el NAD^+ que se le está proporcionando para producir NADH en una reacción de oxidación de un sustrato endógeno.

Debido a que las células que se usaron para la determinación de la actividad BADH habían crecido en medio selectivo, se puede descartar la posibilidad de que la transformación no se haya llevado a cabo o que las células de levadura hayan expulsado el plásmido. Sin embargo, es muy posible que no se haya inducido la síntesis de la AhyBADH en la levadura, como lo sugiere la SDS-PAGE correspondiente (Figura 22), en la cual no se observa banda alguna cuya movilidad electroforética coincida con la de la AhyBADH y que además indique una sobreexpresión.

Resultados y discusión

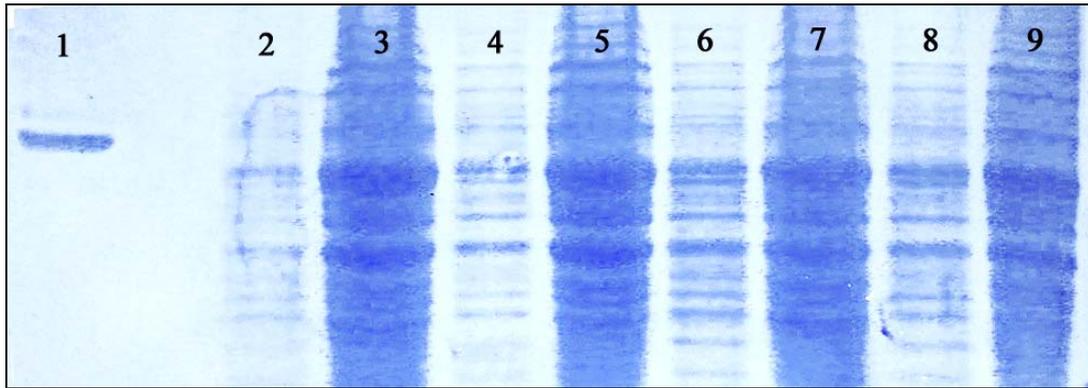


Figura 22. SDS-PAGE del extracto libre de células de *S. cerevisiae* transformadas con pSAL3-*ahybadh*. Carriles: 1) AhyBADH purificada de hojas; 2) sobrenadante y 3) precipitado del extracto de células transformadas con pSAL3; 4) sobrenadante y 5) precipitado del extracto de células transformadas con pSAL3 e inducidas con Cu(II); 6) sobrenadante y 7) precipitado del extracto de células transformadas con pSAL3-*ahybadh*; 8) sobrenadante y 9) precipitado del extracto de células transformadas con pSAL3-*ahybadh* e inducidas con Cu(II).

De hecho, al observar los patrones electroforéticos de los extractos libres de células se puede notar que todos son muy similares y que ninguna banda asemeja una banda de sobreexpresión. Por lo tanto se puede concluir que no se sobreexpresó la AhyBADH en células de *S. cerevisiae* transformadas con pSAL3-*ahybadh* bajo las condiciones de estos experimentos.

Conclusiones

6. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos durante este trabajo se puede concluir que:

En el caso de los sistemas de expresión bacterianos, aunque la AhyBADH puede ser sobreexpresada en células de *E. coli*, lo es en forma inactiva y formando cuerpos de inclusión, a partir de los cuales la proteína puede ser solubilizada pero no replegada en su estado nativo. La sobreexpresión conjunta con chaperonas de *P. aeruginosa* no parece producir la AhyBADH en forma soluble o activa.

En el caso de los sistemas de expresión eucarióticos, las células de levadura no pueden crecer si han aceptado el vector pRS6-*ahybadh*, que hace a la AhyBADH una enzima constitutiva, pero cuando el gen *ahybadh* se clona en pSAL3, que hace a la AhyBADH una enzima inducible, las células de levadura que acepten ese vector pueden crecer con ampicilina en ausencia de uracilo. A pesar de esto, no se produjo AhyBADH en células de *S. cerevisiae* transformadas con el vector pSAL3-*ahybadh*.

7. PERSPECTIVAS

El objetivo principal de este trabajo, la sobreexpresión de la AhyBADH activa en un sistema de expresión adecuado, no se cumplió por completo pues la AhyBADH se produjo como cuerpos de inclusión. Naturalmente, deben probarse diferentes estrategias para lograr tener a la enzima recombinante activa, entre las cuales pueden estar las siguientes, por separado o de manera conjunta.

1. Obtener y clonar el gen nuevamente para descartar la posibilidad de que exista algún error en el gen.

De no existir un error:

2. Inducir la síntesis de la proteína con concentraciones menores del inductor.
3. Inducir a una menor temperatura para disminuir la velocidad de síntesis para que así la célula pueda plegar la proteína a su estructura nativa.
4. Probar diferentes métodos de eliminación del agente solubilizante después de solubilizar los cuerpos de inclusión.
5. Co-expresar el complejo de chaperonas de *E. coli* GroESL para que ayuden al péptido a plegarse correctamente.
6. Usar otro tipo de células eucarióticas, por ejemplo el sistema de baculovirus, para la sobreexpresión de la enzima.
7. Introducir al gen la secuencia señal de una proteína bacteriana secretada para hacer a la AhyBADH una proteína extracelular y facilitar así su purificación.

8. REFERENCIAS

- Ahvazi, B., Coulombe, R., Delarge, M., Vedadi, M., Zhang, L., Meihgen, E. and Vrielink, A., **2000**. Crystal structure of the NADP⁺-dependent aldehyde dehydrogenase from *Vibrio harveyi*: structural implications for cofactor specificity and affinity. *Biochem. J.* 349, 853-861.
- Allen, S. P., Polazzi, J. O., Gierse, J. K. and Easton, A. M., **1992**. Two novel heat shock genes encoding proteins produced in response to heterologous protein expression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 174, 6938-6947.
- Ambroziak, W. and Pietruszko, R., **1991**. Human aldehyde dehydrogenase. Activity with aldehyde metabolites or monoamine, diamines and polyamines. *J. Biol. Chem.* 266, 13011-13018.
- Arakawa, K., Takabe, T., Sugiyama, T. and Akazawa, T., **1987**. Purification of betaine-aldehyde dehydrogenase from spinach leaves and preparation of its antibody. *J. Biochem.* 101, 1485-1488.
- Arakawa, T. and Timasheff, S. N., **1983**. Preferential interactions of proteins with solvent components in aqueous amino acid solutions. *Arch. Biochem. Biophys.* 224, 169-177.
- Arakawa, T. and Timasheff, S. N., **1985**. The stabilization of proteins by osmolytes. *Biophys. J.* 47, 411-414.
- Arís, A., Corchero, J. L., Benito, A., Carbonell, X., Viaplana, E. and Villaverde, A., **1998**. The expression of recombinant genes from bacteriophage lambda strong promoters triggers the SOS response in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* 60, 551-559.
- Ben-Zvi, A. P. and Goloubinoff, P., **2001**. Mechanisms of disaggregation and refolding of stable protein aggregates by molecular chaperones. *J. Struct. Biol.* 135, 84-93.
- Boch, J., Kempf, B., Schmid, R. and Bremer, E., **1996**. Synthesis of the Osmoprotectant Glycine Betaine in *Bacillus subtilis*: Characterization of the *gbsAB* Genes. *J. Bacteriol.* 178, 5121-5129.

Referencias

- Boch, J., Nau-Wagner, G., Kneip, S. and Bremer, E., **1997**. Glycine betaine aldehyde dehydrogenase from *Bacillus subtilis*: characterization of an enzyme required for the synthesis of the osmoprotectant glycine betaine. *Arch. Microbiol.* 168, 282-289.
- Bradford, M. M., **1976**. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 112, 195-203.
- Brauner, F., Sebela, M., Snegaroff, J., Pec, P. and Meunier, J. C., **2003**. Pea seedling aminoaldehyde dehydrogenase: primary structure and active site residues. *Plant Physiol. Bioch.* 41, 1-10.
- Brouquisse, R., Weigel, P., Thodes, D., Yocum, C. F. and Hanson, A. D., **1989**. Evidence for a ferredoxin-dependent choline monooxygenase from spinach chloroplast stroma. *Plant Physiol.* 90, 322-329.
- Burnet, M., Lafontaine, P. J. and Hanson, A. D., **1995**. Assay, purification, and partial characterization of choline monooxygenase from spinach. *Plant Physiol.* 108, 581-588.
- Chern, M.-K. and Pietruszko, T., **1995**. Human aldehyde dehydrogenase E3 isoenzyme is a betaine aldehyde dehydrogenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 213, 561-568.
- Cleland, W. W., **1963**. The kinetics of enzyme-catalyzed reactions with two or more substrates or products. *Biochim. Biophys. Acta* 67, 104-137.
- Cobessi, D., Tête-Favier, F., Marchal, S., Azza, S., Branlant, G. and Aubry, A., **1999**. Apo and holo crystal structures of an NADP-dependent aldehyde dehydrogenase from *Streptococcus mutans*. *J. Mol. Biol.* 290, 161-173.
- Corchero, J. L., Viaplana, E., Benito, A. and Villaverde, A., **1996**. The position of the heterologous domain can influence the solubility and proteolysis of β -galactosidase fusion proteins. *J. Biotechnol.* 48, 191-200.
- Corchero, J. L. and Villaverde, A., **1998**. Plasmid maintenance in *Escherichia coli* recombinant cultures is dramatically, steadily and specifically influenced by features of the encoded proteins. *Biotechnol. Bioeng.* 58, 625-632.

Referencias

- Courtenay, E. S., Capp, M. W., Anderson, C. F. and Record, M. T., Jr, **2000**. Vapor pressure osmometry studies of osmolyte-protein interactions: implications for the action of osmoprotectants *in vivo* and for the interpretation of 'osmotic stress' experiments *in vitro*. *Biochemistry* 39, 4455-4471.
- Cserjan-Puschmann, M., Kramer, W., Duerrschmid, E., Striedner, G. and Baker, K., **1999**. Metabolic approaches for the optimisation of recombinant fermentation processes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53, 43-50.
- DeLano, W. L., **2002**. The PyMOL Molecular Graphics System. <http://www.pymol.org>
- Du Vigneaud, V., Chandler, J. P., Simmonds, S., Moyer, A. W. and Cohn, M., **1946**. The role of dimethyl- and monomethylamino-ethanol in transmethylation reactions *in vivo*. *J. Biol. Chem.* 164.
- Ecker, D. J., Butt, T. R., Sternberg, E. J., Neeper, M. P., Debouck, C., Goan, J. A. and Crooke, S. T., **1986**. Yeast metallothionein function in metal ion detoxification. *J. Biol. Chem.* 261, 16895-16900.
- Ehrnsperger, M., Graber, S., Gaestel, M. and Buchner, J., **1997**. Binding of non-native protein to Hsp25 during heat shock creates a reservoir of folding intermediates for reactivation. *EMBO J.* 16, 221-229.
- Enfors, S. O., **1992**. Control of *in vivo* proteolysis in the production of recombinant proteins. *Trends Biotechnol.* 10, 310-315.
- Falkeberg, P. and Strom, A. R., **1990**. Purification and characterization of osmoregulatory betaine aldehyde dehydrogenase of *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* 1034, 253-259.
- Falkeberg, P. and Strom, A. R., **1990**. Purification and characterization of osmoregulatory betaine aldehyde dehydrogenase from *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* 1034.
- Farrés, J., Wang, T., Cunningham, J. and Weiner, H., **1995**. Investigation of the active site cysteine residue of rat liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase by site-directed mutagenesis. *Biochemistry* 34, 2592-2598.
- Feldman, R. I. and Weiner, H., **1972**. Horse liver aldehyde dehydrogenase characterization. *J. Biol. Chem.* 247, 260-266.

Referencias

- Figueroa-Soto, C. G. and Valenzuela-Soto, E. M., **2000**. Kinetic study of porcine kidney betaine aldehyde dehydrogenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 269, 596-603.
- Furst, P., Hu, S., Hackett, R. and Hamer, D., **1988**. Copper activates metallothionein gene transcription by altering the conformation of a specific DNA binding protein. *Cell* 55, 705-717.
- Georgiou, G. and Valax, P., **1996**. Expression of correctly folded proteins in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.* 7, 190-197.
- Gill, R. T., Valdes, J. J. and Bentley, W. E., **2000**. A comparative study of global stress gene regulation in response to overexpression of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Metab. Eng.* 2, 178-189.
- Glenn, J. L. and Vanko, M., **1959**. Choline and aldehyde oxidation by rat liver. *Arch. Biochem. Biophys.* 82, 145-152.
- González-Segura, L., Velasco-García, R., Rudiño-Piñera, E., Mújica-Jimenez, C. and Muñoz-Clares, R. A., **2005**. Site-directed mutagenesis and homology modeling indicate an important role of cysteine 439 in the stability of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochimie* 87, 1056-1064.
- Grumet, R. and Hanson, A. D., **1986**. Genetic evidence for an osmoregulatory function of glycinebetaine accumulation in barley. *Aust. J. Plant Physiol.* 13, 353-364.
- Grunewald, R. W. and Eckstein, A., **1995**. Osmotic regulation of the betaine metabolism in immortalized renal cells. *Kidney Int.* 48, 1714-1720.
- Guo, Y., Zhang, L., Xiao, G., Cao, S.-Y., Gu, D.-M., Tian, W.-Z. and Chen, S.-Y., **1997**. Expression of betaine aldehyde dehydrogenase gene and salinity tolerance in rice transgenic plants. *Sci. China* 40, 496-501.
- Guzmán-Partida, A. M. and Valenzuela-Soto, E. M., **1998**. Porcine kidney betaine aldehyde dehydrogenase: purification and properties. *Comp. Biochem. Physiol.* 119, 485-491.
- Hamer, D. H., Thiele, D. J. and Lemontt, J. E., **1985**. Function and autoregulation of yeast copperthionein. *Science* 228, 685-690.

Referencias

- Harcum, S. W. and Bentley, W. E., **1999**. Heat-shock and stringent responses have overlapping protease activity in *Escherichia coli*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 80, 23-37.
- Hempel, J., von Bahr-Lindstrom, H. and Jornvall, H., **1984**. Aldehyde dehydrogenase from human liver: Primary structure of the cytoplasmic isoenzyme. *Eur. J. Biochem.* 141, 21-35.
- Hibino, T., Meng, Y. L., Kawamitsu, Y., Uehara, N., Matsuda, N., Tanaka, Y., Ishikawa, H., Baba, S., Takabe, T., Wada, K., Ishii, T. and Takabe, T., **2001**. Molecular cloning and functional characterization of two kinds of betaine aldehyde dehydrogenase in betaine betaine-accumulating mangrove *Avicennia marina*. *Plant Mol. Biol.* 45, 353-363.
- Hjelmqvist, L., Norin, A., El-Ahmad, M., Griffiths, W. and Jornvall, H., **2003**. Distinct but parallel evolutionary patterns between alcohol and aldehyde dehydrogenases: addition of fish/human betaine aldehyde dehydrogenase divergence. *Cell Mol. Life Sci.* 60, 2009-2016.
- Hoffman, F. and Rinas, U., **2000**. Kinetics of heat-shock response and inclusion body formation during temperature-induced production of basic fibroblast growth factor in high-cell-density cultures of recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol. Progr.* 16, 1000-1007.
- Hoffman, F. and Rinas, U., **2001**. Plasmid amplification in *Escherichia coli* after temperature upshift is impaired by induction of recombinant protein synthesis. *Biotechnol. Lett.* 23, 1819-1825.
- Huang, J., Hirji, R., Adam, L., Rozwadowski, K. L., Hammerlindl, J. K., Keller, W. A. and Selvaraj, G., **2000**. Genetic engineering of glycine-betaine production toward enhancing stress tolerance in plants: metabolic limitations. *Plant Physiol.* 122, 747-756.
- Hulse, J. D. and Henderson, L. M., **1980**. Carnitine biosynthesis. Purification of 4-*N*-trimetilaminobutyraldehyde dehydrogenase from beef liver. *J. Biol. Chem.* 255, 1146-1151.
- Ignatova, Z., Mahsunah, A., Georgieva, M. and Kasche, V., **2003**. Improvement of posttranslational bottlenecks in the production of penicillin amidase in recombinant *Escherichia coli* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 1237-1245.

Referencias

- Incharoensakdi, A., Matsuda, N., Hibino, T., Meng, Y. L., Ishikawa, H., Hara, A., Funaguma, T., Takabe, T. and Takabe, T., **2000**. Overproduction of spinach betaine aldehyde dehydrogenase in *Escherichia coli*. Structural and functional properties of wild-type, mutants and *E. coli* enzymes. *Eur. J. Biochem.* 267, 7015-7023.
- Jacob, F. and Monod, J., **1961**. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J. Mol. Biol.* 3, 318-356.
- Jacoby, W. J.: Aldehyde dehydrogenases. In: Boyer, P.D. (Ed.), The enzymes. Academic Press, New York, 1963, pp. 203-221.
- Jakoby, W. B. and Fredericks, J., **1959**. Pyrrolidine and putrescine metabolism: γ -aminobutyraldehyde dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 234, 2145-2150.
- Jia, G.-X., Zhu, Z.-Q., Chang, F.-Q. and Li, Y.-X., **2002**. Transformation of tomato with the *BADH* gene from *Atriplex* improves salt tolerance. *Plant Cell Rep.* 21, 141-146.
- Johansson, K., El-Ahmad, M., Ramaswawamy, S., Hjelmqvist, L., Jornvall, H. and Eklund, H., **1998**. Structure of betaine aldehyde dehydrogenase at 2.1 Å resolution. *Prot. Sci.* 7, 2106-2117.
- Julián-Sánchez, A., Riveros-Rosas, H., Martínez-Castilla, L. P., Velasco-García, R. and Muñoz-Clares, R. A.: Phylogenetic and structural relationships of the betaine aldehyde dehydrogenases. In: Weiner, H., Maser, E., Lindahl, R. and Plapp, B. (Eds.), Enzymology and molecular biology of carbonyl metabolism. Purdue University Press, West Lafayette, Indiana, 2007.
- Jürgen, B., Lin, H. Y., Riemschneider, S., Scharf, C., Neubauer, P., Schmid, R., Hecker, M. and Schweder, T., **2000**. Monitoring of genes that respond to overproduction of an insoluble recombinant protein in *Escherichia coli* glucose-limited fed-batch fermentations. *Biotechnol. Bioeng.* 70, 217-224.
- Kopito, R. R., **2000**. Aggresomes, inclusion bodies and proteins. *Trends Cell Biol.* 10, 217-224.
- Korstee, G. J. J., **1970**. The aerobic decomposition of choline by microorganisms. *Arch. Mikrobiol.* 71, 235-244.
- Krzywicki, K. A. and Brandriss, M. C., **1984**. Primary structure of the nuclear PUT2 gene involved in the mitochondrial pathway for proline utilization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 4, 2837-2842.

Referencias

- Kurys, G., Ambroziak, W. and Pietruszco, R., **1989**. Human aldehyde dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 264, 4715-4721.
- Laemmli, U. K., **1970**. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lamb, A. L. and Newcomer, M. E., **1999**. The Structure of Retinal Dehydrogenase Type II at 2.7 Å Resolution: Implications for Retinal Specificity. *Biochemistry* 38, 6003-6011.
- Lee, J., Kim, H. C., Kim, S. W., Hong, S. I. and Park, Y. H., **2002**. Interplay of SOS induction, recombinant gene expression, and multimerization of plasmid vectors in *Escherichia coli* *Biotechnol. Bioeng.* 80, 84-92.
- Legaría, J., Rajsbaum, R., Muñoz-Clares, R. A., Villegas-Sepúlveda, J., Simpson, J. and Iturriaga, G., **1998**. Molecular characterization of two genes encoding betaine aldehyde dehydrogenase from amaranth. Expression in leaves under short-term exposure to osmotic stress or abscisic acid. *Gene* 218, 69-76.
- Levering, P. R., van Dijken, J. P., Veenhuis, M. and Harder, W., **1981**. *Arthrobacter* P1, a fast growing versatile methylotroph with amine oxidase as a key enzyme in the metabolism of methylated amines. *Arch. Microbiol.* 129, 72-80.
- Li, Y.-X., Chang, F.-Q., Du, L.-Q., Guo, B.-H., Li, H.-J., Zhang, J.-S., Chen, S.-Y. and Zhu, Z.-Q., **2000**. Genetic transformation of watercress with a gene encoding for betaine aldehyde dehydrogenase (BADH). *Acta Bot. Sin.* 42, 480-484.
- Lin, H. Y., Hanschke, R., Nicklisch, S., Nietsche, T., Jarchow, R., Schwahn, C., Riemschneider, S., Meyer, S., Gupta, A., Hecker, M. and Neubauer, P.: Cellular responses to strong overexpression of recombinant genes in *Escherichia coli* DNA relaxation and cell death after induction of alpha-glucosidase. In: Merten, O.W., Mattanovich, D., Lang, C., Larsson, G., Neubauer, P., Porro, D., ostma, P.W., Teixeira de Mattos, J., Cole, J. (Ed.), *Recombinant Protein Production with Prokaryotic and Eukaryotic Cells. A Comparative View on Host Physiology*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 2001, pp. 55-74.

Referencias

- Lin, S. W., Chen, J. C., Hsu, L. C., Hsieh, C. L. and Yoshida, A., **1996**. Human γ -aminobutyraldehyde dehydrogenase (ALDH9): cDNA sequence, genomic organization, polymorphism, chromosomal localization, and tissue expression. *Genomics* 34, 376-380.
- Lindahl, R. and Hempel, J., **1991**. Aldehyde dehydrogenase: What can be learned from a baker's dozen sequences? *Adv. Exp. Med. Biol.* 284, 1-8.
- Lindahl, R., **1992**. Aldehyde dehydrogenases and their role in carcinogenesis. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 27, 283-335.
- Liu, F.-H., Guo, Y., Gu, D.-M., Xiao, G., Chen, Z.-H. and Chen, S.-Y., **1997a**. Salt tolerance of transgenic plants with *BADH* cDNA. *Acta Genet. Sin.* 24, 54-58.
- Liu, Z., Sun, Y. J., Rose, J., Chung, Y., Hsiao, C. D., Chang, W. R., Ingrid, K., Perozich, J., Lindahl, R., Hempel, J. and Wang, B. C., **1997b**. The first structure of an aldehyde dehydrogenase reveals novel interaction between NAD^+ and the Rossmann fold. *Nat. Struct. Biol.* 4, 317-326.
- Mascorro-Gallardo, J. O.: Caracterización del gen *SITPS1* de *Selaginella lepidophylla* por complementación funcional de *Saccharomyces cerevisiae*, Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, 2000.
- McCue, K. F. and Hanson, A. D., **1990**. Drought and salt tolerance: towards understanding and application. *Trends Biotechnol.* 8, 358-362.
- Meskys, R., Harris, R. J., Casaite, V., Basran, J. and Scruton, N. S., **2001**. Organization of the genes involved in dimethylglycine and sarcosine degradation in *Arthrobacter* spp. Implications for glycine betaine catabolism. *Eur. J. Biochem.* 268, 3390-3398.
- Moore, S. A., Baker, H. M., Blythe, T. J., Kitson, K. E., Kitson, T. M. and Baker, E. N., **1998**. Sheep liver cytosolic aldehyde dehydrogenase: the structure reveals the basis for the retinal specificity of class 1 aldehyde dehydrogenases. *Structure* 6, 1541-1551.
- Mori, N., Fuchigami, S. and Kitamoto, Y., **2002**. Purification and properties of betaine aldehyde dehydrogenase with high affinity for NADP from *Arthrobacter globiformis*. *J. Biosci. Bioeng.* 93, 130-135.

Referencias

- Mori, N., Yoshida, N. and Kitamoto, Y., **1992**. Purification and properties of betaine aldehyde dehydrogenase from *Xanthomonas translucens*. *J. Ferment. Bioeng.* 73, 352-356.
- Muñoz-Clares, R. A., González-Segura, L., Mújica-Jiménez, C. and Contreras-Díaz, L., **2003**. Ligand-induced conformational changes of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa* and *Amaranthus hypochondriacus* leaves affecting the reactivity of the catalytic thiol. *Chem.-Biol. Interact.* 143-144, 129-137.
- Muñoz-Clares, R. A. and Mújica-Jiménez, C., **2001**. Complexes of NADH with betaine aldehyde dehydrogenase from leaves of the plant *Amaranthus hypochondriacus* L. *Chem. Biol. Interact.* 130-132, 71-80.
- Muñoz-Clares, R. A., Vojtechová, M., Mújica-Jiménez, C. and Rodríguez-Sotres, R., **1997**. Effects of glycerol on the kinetic properties of betaine aldehyde dehydrogenase. *Adv. Exp. Med. Biol.* 414, 261-268.
- Muntz, J. A., **1950**. The inability of choline to transfer a methyl group directly to homocysteine for methionine formation. *J. Biol. Chem.* 182, 489-499.
- Nagasawa, T., Kawabata, Y. and Ogata, K., **1976**. Purification and characterization of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Agric. Biol. Chem.* 40, 1743-1749.
- Nakamura, T., Nomura, M., Mori, H., Jagendorf, A. T., Ueda, A. and Takabe, T., **2001**. An isozyme of betaine aldehyde dehydrogenase in barley. *Plant Cell Physiol* 42, 1088-1092.
- Nakamura, T., Yokota, S., Muramoto, Y., Tsutsui, K., Oguri, Y., Fukui, K. and Takabe, T., **1997**. Expression of a betaine aldehyde dehydrogenase gene in rice, a glycinebetaine nonaccumulator, and possible localization of its protein in peroxisomes. *Plant J.* 11, 1115-1120.
- Nehlin, J. O., Carlberg, M. and Ronne, H., **1989**. Yeast galactose permease is related to yeast and mammalian glucose transporters. *Gene* 85, 313-319.
- Niegemann, E., Schulz, A. and Bartsch, K., **1993**. Molecular organization of the *Escherichia coli* gab cluster: nucleotide sequence of the structural genes gabD and gabP and expression of the GABA permease gene. *Arch. Microbiol.* 160, 454-460.

Referencias

- Nuccio, M. L., Russel, B. L., Nolte, K. D., Rathinasabapathi, B., Gage, D. A. and Hanson, A. D., **1998**. The endogenous choline supply limits glycinebetaine synthesis in transgenic tobacco expressing choline monooxygenase. *Plant J.* 16, 487-496.
- Oberg, K., Chrnyk, B. A., Wetzel, R. and Fink, A. L., **1994**. Native-like secondary structure in interleukin-1 beta inclusion bodies by attenuated total reflectance FTIR. *Biochemistry* 33, 2628-2634.
- Oishi, H. and Ebina, M., **2005**. Isolation of cDNA and enzymatic properties of betaine aldehyde dehydrogenase from *Zoysia tenuifolia*. *J. Plant Physiol.* 162, 1077-1086.
- Park, S. J., Georgiou, G. and Lee, S. Y., **1999**. Secretory production of recombinant protein by a high cell density culture of a protease negative mutant *Escherichia coli* strain. *Biotechnol. Progr.* 15, 164-167.
- Park, S. J., Lee, S.K., Lee, B.J., **2002**. Effect of tandem rare codon substitution and vector-host combinations on the expression of the EBV gp110 C-terminal domain in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* 24, 470-480.
- Perozich, J., Nicholas, H., Wang, B. C., Lindahl, R. and Hempel, J., **1999**. Relationships within the aldehyde dehydrogenase extended family. *Protein Sci.* 8, 137-146.
- Petronini, P. G., De Angelis, E. M., Borghetti, P., Borghetti, A. F. and Wheeler, K. P., **1992**. Modulation by betaine of cellular responses to osmotic stress. *Biochem J.* 282, 69-73.
- Pietruszko, R. and Chern, M., **2001**. Betaine aldehyde dehydrogenase from rat liver mitochondrial matrix. *Chem. Biol. Interact.* 193, 130-132.
- Pietruszko, R., Kikonyogo, A., Chern, M. K. and Izaguirre, G., **1997**. Human aldehyde dehydrogenase E3. Further characterization. *Adv. Exp. Med. Biol.* 414, 243-252.
- Przybycien, T. M., Dunn, J. P., Valax, P. and Georgiou, P., **1994**. Secondary structure characterization of beta-lactamase inclusion bodies. *Protein Eng.* 7, 131-136.
- Racker, E., **1949**. Bovine liver aldehyde dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 177, 883-892.

Referencias

- Rathinasabapathi, B., McCue, K. F., Gage, D. A. and Hanson, A. D., **1994**. Metabolic engineering of glycinebetaine synthesis: plant betaine aldehyde dehydrogenases lacking typical transit peptides are targeted to tobacco chloroplasts where they confer betaine aldehyde resistance. *Planta* 193, 155-162.
- Rhodes, D. and Hanson, A. D., **1993**. Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 44, 357-384.
- Rinas, U., **1996**. Synthesis rates of cellular proteins involved in translation and protein folding are strongly altered in response to overproduction of basic fibroblast growth factor by recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol. Progr.* 12, 196-200.
- Rosen, R., Biran, D., Gur, E., Becher, D., Hecker, M. and Ron, E. Z., **2002**. Protein aggregation in *Escherichia coli*: role of proteases. *FEMS Microbiol. Lett.* 207, 9-12.
- Rossmann, M. G., Liljas, A., Brändén, C. I. and Banaszak, L. J., **1975**. *Enzymes* 11, 61-102.
- Rothschild, H. A. and Guzmán-Barrón, E. S., **1954**. The oxidation of betaine aldehyde by betaine aldehyde dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 209, 511-523.
- Rzhetsky, A., Ayala, F. J., Hsu, L. C., CHang, C. and Yoshida, A., **1997**. Exon/intron structure of aldehyde dehydrogenase supports the "introns-late" theory. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 94, 6820-6825.
- Saneoka, H., Nagasaka, C., Hanh, D. T., Yang, W.-J., Premachandra, G. S., Joly, R. J. and Rhodes, D., **1995**. Salt tolerance of glycinebetaine-deficient and -containing maize lines. *Plant Physiol.* 107, 631-638.
- Schmidt, M., Viaplana, E., Hoffmann, F., Marten, S., Villaverde, A. and Rinas, U., **1999**. Secretion-dependent proteolysis of heterologous protein by recombinant *Escherichia coli* is connected to an increased activity of the energy-generating dissimilatory pathway. *Biotechnol. Bioeng.* 66, 61-67.
- Schröder, H., Langer, T., Hartl, F. U. and Bukau, B., **1993**. DnaK, DnaJ and GrpE form a cellular chaperone machinery capable of repairing heat-induced protein damage. *EMBO J.* 12, 4137-4144.

Referencias

- Schwarz, E., Lilie, H. and Rodolph, R., **1996**. The effect of molecular chaperones on *in vivo* and *in vitro* folding processes. *Biol. Chem.* 377, 411-416.
- Schweder, T., Lin, H. Y., Jurgen, B., Blomsten, G., Enfors, S. O. and Hecker, M., **1999**. Monitoring of genes that respond to process-related stress in large-scale bioprocesses. *Biotechnol. Bioeng.* 65, 151-159.
- Schweder, T., Lin, H. Y., Jurgen, B., Breitenstein, A., Riemschneider, S., Khalameyzer, V., Gupta, A., Buttner, K. and Neubauer, P., **2002**. Role of the general stress response during strong overexpression of a heterologous gene in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58, 330-337.
- Smith, L. T., Pocard, J. A., Bernard, T. and Le Rudulier, D., **1988**. Osmotic control of glycine betaine biosynthesis and degradation in *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 170, 3142-3149.
- Steinman, C. R. and Jakoby, W. B., **1967**. Yeast aldehyde dehydrogenase. 1. Purification and crystallization. *J. Biol. Chem.* 242, 5019-5023.
- Steinmetz, C. G., Xie, P., Weiner, H. and Hurley, T. D., **1997**. Structure of mitochondrial aldehyde dehydrogenase: the genetic component of ethanol aversion. *Structure* 5.
- Stryer, L., Tymoczko, J. and Berg, J.: Biochemistry, 5th ed. W. H. Freeman and Company, New York, 2002.
- Styvold, O. B., Falkenberg, P., Landfald, B., Eshoo, M. W., Bjørnsen, T. and Ström, A. R., **1986**. Selection, mapping, and characterization of *Escherichia coli* mutants blocked in the choline-glycinebetaine pathway. *J. Bacteriol.* 165, 856-863.
- Tokatlidis, K., Dhurjati, P., Millet, J., Beguin, P. and Aubert, J. P., **1991**. High activity of inclusion bodies formed in *Escherichia coli* overproducing *Clostridium thermocellum* endoglucanase D. *FEBS Lett.* 282, 205-208.
- Trossat, C., Rathinasabapathi, B. and Hanson, A. D., **1997**. Transgenically expressed betaine aldehyde dehydrogenase efficiently catalyzes oxidation of dimethylsulfoniopropionaldehyde and ω -aminoaldehydes. *Plant Physiol.* 113, 1457-1461.
- Valenzuela-Soto, E. M. and Muñoz-Clares, R. A., **1993**. Betaine aldehyde dehydrogenase from leaves of *Amaranthus hypochondriacus* L. exhibits an Iso ordered Bi Bi steady state mechanism. *J. Biol. Chem.* 268, 23818-23824.

Referencias

- Valenzuela-Soto, E. M. and Muñoz-Clares, R. A., **1994**. Purification and properties of betaine aldehyde dehydrogenase extracted from detached leaves of *Amaranthus hypochondriacus* L. subjected to water deficit. *J. Plant Physiol.* 143, 145-152.
- Vasiliou, V., Bairoch, A., Tipton, K. F. and Nebert, D. W., **1999**. Eukaryotic aldehyde dehydrogenase (ALDH) genes: human polymorphisms, and recommended nomenclature based on divergent evolution and chromosomal mapping. *Pharmacogenetics* 9, 421-434.
- Vaz, F. M., Fouchier, S. W., Ofman, R., Sommer, M. and Wanders, R. J., **2000**. Molecular and biochemical characterization of rat γ -trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase and evidence for the involvement of human aldehyde dehydrogenase 9 in carnitine biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 275, 7390-7394.
- Veinger, L., Diamant, S., Buchner, J. and Goloubinoff, P., **1998**. The small heat-shock protein IbpB from *Escherichia coli* stabilizes stress-denatured proteins for subsequent refolding by a multichaperone network. *J. Biol. Chem.* 273, 11032-11037.
- Velasco-García, R., Chacón-Aguilar, V. M., Hervert-Hernández, D. and Muñoz-Clares, R. A., **2003**. Inactivation of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa* and *Amaranthus hypochondriacus* leaves by disulfiram. *Chem.-Biol. Interact.* 143-144, 149-158.
- Velasco-García, R., González-Segura, L. and Muñoz-Clares, R. A., **2000**. Steady-state kinetic mechanism of NADP⁺-dependent reactions catalyzed by betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem. J.* 352, 675-683.
- Velasco-García, R., Mújica-Jiménez, C., Mendoza-Hernández, G. and Muñoz-Clares, R. A., **1999**. Rapid purification and properties of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 181, 1292-1300.
- Velasco-García, R., Villalobos, M. A., Ramírez-Romero, M. A., Mújica-Jiménez, C., Iturriaga, G. and Muñoz-Clares, R. A., **2005**. Betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*: cloning, over-expression in *Escherichia coli*, and regulation by choline and salt. *Arch. Microbiol.* 185, 14-22.

Referencias

- Viaplana, E. and Villaverde, A., **1996**. Polylinker-encoded peptides can confer toxicity to recombinant proteins produced in *E. coli*. . *Biotechnol. Progr.* 12, 723-727.
- Villaverde, A. and Carrió, M. M., **2003**. Protein aggregation in recombinant bacteria: biological role of inclusion bodies. *Biotechnol. Lett.* 25, 1385-1395.
- Voet, D. and Voet, J.: Biochemistry, 2nd ed. John Wiley & Sons, Inc., New York, 1995.
- Vojtechová, M., Hanson, A. D. and Muñoz-Clares, R. A., **1997a**. Betaine aldehyde dehydrogenase from amaranth leaves efficiently catalyzes the NAD⁺-dependent oxidation of dimethylsulfoniopropionaldehyde to dimethylsulfoniopropionate. *Arch. Biochem. Biophys.* 337, 81-88.
- Vojtechová, M., Rodríguez-Sotres, R. and Muñoz-Clares, R. A., **1999**. Inactivation of betaine aldehyde dehydrogenase from amaranth leaves by pyridoxal 5'-phosphate. *Plant Sci.* 143, 9-17.
- Vojtechová, M., Rodríguez-Sotres, R., Valenzuela-Soto, E. M. and Muñoz-Clares, R. A., **1997b**. Substrate inhibition by betaine aldehyde of betaine aldehyde dehydrogenase from leaves of *Amaranthus hypochondriacus* L. *Biochim. Biophys. Acta* 1341, 49-57.
- Wall, J. G. and Plückthun, A., **1995**. Effects of overexpressing folding modulators on the *in vivo* folding of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.* 6, 507-516.
- Walter, S., **2002**. Structure and function of the GroE chaperone. *Cell Mol. Life Sci.* 59, 1589-1597.
- Weber, J., Hoffmann, F. and Rinas, U., **2002**. Metabolic adaptation of *Escherichia coli* during temperature-induced recombinant protein production: 2. redirection of metabolic fluxes. *Biotechnol. Bioeng.* 80, 320-330.
- Wegrzyn, G. and Wegrzyn, A., **2002**. Stress responses and replication of plasmid in bacterial cells. *Microb. Cell Fact.* 1.
- Weigel, P., Weretylnyk, E. A. and Hanson, A. D., **1986**. Betaine aldehyde oxidation by spinach chloroplasts. *Plant Physiol.* 82, 753-759.

Referencias

- Weiner, H., Farrés, J., Rout, U. J., Wang, X. and Zheng, C. F.: Site directed mutagenesis to probe for active site components of liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase. *Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism 5*. Plenum Press, New York, 1995, pp. 1-7.
- Weretilnyk, E. A., Bednarek, S., McCue, K. F., Rhodes, D. and Hanson, A. D., **1989**. Comparative biochemical and immunological studies of the glycine betaine synthesis pathway in diverse families of dicotyledons. *Planta* 178, 342-352.
- Weretilnyk, E. A. and Hanson, A. D., **1989**. Betaine aldehyde dehydrogenase from spinach leaves: Purification, *in vitro* translation of the mRNA, and regulation by salinity. *Arch. Biochem. Biophys.* 271, 56-63.
- Wilken, D. R., McMacken, M. L. and Rodríguez, A., **1970**. Choline and betaine aldehyde oxidation by rat liver mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* 216, 305-317.
- Winge, D. R., Nielson, K. B., Gray, W. R. and Hamer, D. H., **1985**. Yeast metallothionein. *J. Biol. Chem.* 260, 14464-14470.
- Worrall, D. M. and Goss, N. H., **1989**. The formation of biologically active beta-galactosidase inclusion bodies in *Escherichia coli*. *Aust. J. Biotechnol.* 3, 28-32.
- Yancey, P. H., Clark, M. E., Hand, S. C., Bowlus, R. D. and Somero, G. N., **1982**. Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science* 217, 1214-1217.
- Yokohama, S., **2003**. Protein expression systems for structural genomics and proteomics. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 7, 39-43.
- Yoshida, A., Rzhetsky, A., Hsu, L. C. and Chang, C., **1998**. Human aldehyde dehydrogenase gene family. *Eur. J. Biochem.* 251, 549-557.