



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

---

---

FACULTAD DE QUÍMICA

CLONACIÓN Y EXPRESIÓN DE LA SUBUNIDAD  
ASA8 DE LA ATP SINTASA MITOCONDRIAL DEL  
ALGA INCOLORA *Polytomella sp.*

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

P R E S E N T A:

**HÉCTOR VICENTE MIRANDA ASTUDILLO**





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:** Profesor: Dra. Rosario Adelaida Muñoz Clares

**VOCAL:** Profesor: Dr. Jesús Fernando Montiel Aguirre

**SECRETARIO:** Profesor: Dr. Diego González Halphen

**1er. SUPLENTE:** Profesor: Dra. María Benita Leonor Fernández Salgado

**2° SUPLENTE:** Profesor: Dr. León Patricio Martínez Castilla

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**LABORATORIO 324 NORTE DEL INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM**

---

**ASESOR DEL TEMA: DR. DIEGO GONZÁLEZ HALPHEN**

---

(nombre y firma)

**SUPERVISOR TÉCNICO (Si lo hay):**

---

(nombre y firma)

**SUSTENTANTE (S): HÉCTOR VICENTE MIRANDA ASTUDILLO**

---

(nombre (s) y firma (s) )

El presente trabajo se llevó a cabo en el laboratorio 324 Norte del Departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Diego González Halphen.

Este trabajo fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través del donativo No. 56619 y por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) a través del donativo IN217108.

Agradezco la ayuda técnica de la Q. B. P. Miriam Vázquez Acevedo en la realización del presente trabajo.

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, a la Facultad de Química y al Instituto de Fisiología Celular por la oportunidad de realizar mis estudios profesionales.

A los miembros del Honorable Jurado por la revisión del manuscrito de tesis y por sus valiosas sugerencias.

Este trabajo representa la conclusión de un esfuerzo y de una etapa muy importantes en mi vida; ser Químico Farmacéutico Biólogo orgullosamente universitario representa una gran meta alcanzada.

Soy un hombre feliz ya que a lo largo de mi vida he estado rodeado de personas que me han apoyado de distintas formas con su cariño, experiencia y tiempo; personas que han creído en mí y que gracias a ellos esta meta fue posible.

Quiero agradecer especialmente:

A mis padres por todo su amor, apoyo y comprensión en los buenos y malos momentos; porque nunca han dejado de creer en mí y continúan siempre a mi lado. ¡Gracias papás! Esto es para ustedes...

A mi hermano Luis Daniel porque siempre puedo contar contigo, así como tu conmigo.

A Mónica por tu amor, por estar siempre a mi lado, por tu entusiasmo y por la chispa que me motiva a ser una mejor persona...

A mi tios: Edilberto, Andrés y Carmen por su apoyo y cariño a lo largo de toda mi vida.

Al doctor Diego por abrirme las puertas, por su apoyo y paciencia; por su amistad y sus consejos.

A Miriam por ayudarme a lo largo de este tiempo, por su amistad y por alegrar cada día con su risa.

A Paco por su amistad, su experiencia y por mostrarme un lado amable de la ciencia; por que un maestro no es aquel que da clases sino aquel que fomenta el entusiasmo por aprender.

A mis compañeros del laboratorio (mi nueva casa): Alexa, Valentín, Araceli, Luis, Alain, Sergio, Elizabeth y Alejandra, por su amistad, sus consejos y apoyo, por hacer de cada día una grata experiencia; al señor Alfredo por su apoyo y su disposición para ayudar siempre.

A mis maestros a lo largo de la carrera, especialmente al maestro Misael González Ibarra por contagiarme su entusiasmo por el conocimiento, así como por enseñarme que el conocimiento es para transmitirse y a la maestra Isaura Luisa Carrera García por enseñarme que no importa lo que uno vaya a realizar siempre se debe entender lo que se esta haciendo para hacerlo bien.

A mis amigos durante esta larga estancia en la facultad, muchas gracias por todos esos momentos de alegría y tristeza, por crecer conmigo, por tener siempre una sonrisa, porque a pesar de que el tiempo pase y cada uno continúe su camino siempre quedará el recuerdo de todo lo vivido juntos que ayudó a formarnos como personas y hacer de nuestra escuela un segundo hogar, ya saben: todos los caminos llevan a la facultad...

Ciudad Universitaria, México

Febrero 2009

Héctor Vicente Miranda Astudillo

## **DEDICATORIAS**

A mis padres Pedro y Adela con mucho amor y admiración.

A mi hermano Luis Daniel con cariño.

A Mónica con amor y por un futuro juntos.

¡Que vivan los estudiantes,  
jardín de las alegrías!  
Pajarillos libertarios,  
igual que los elementos.  
Caramba y zamba la cosa  
¡vivan los experimentos!

No sobran maestros,  
lo que faltan son escuelas.



## ÍNDICE

Resumen	<i>i</i>
Abreviaturas	<i>ii</i>
1. Introducción	1
1.1. Las mitocondrias	1
1.2. Origen de las mitocondrias	2
1.3. Estructura de las mitocondrias	3
1.4. Relación con el metabolismo celular	4
1.5. Cadena respiratoria y síntesis de ATP	6
1.6. Complejo V (F <sub>1</sub> F <sub>0</sub> ATP sintasa)	8
1.7. Síntesis de ATP	10
1.8. Algas clorofíceas	11
1.9. Dimerización y subunidades ASA	13
2. Justificación	17
3. Objetivos	17
4. Estrategia experimental	18
5. Materiales y métodos	19
5.1. Amplificación del gen <i>asa8</i> de <i>Polytomella sp</i> y clonación en el vector pGEM-T Easy	19
5.1.1. Diseño de oligonucleótidos	19
5.1.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	19
5.1.3. Adición de adenina al extremo del producto de PCR	20
5.1.4. Ligación en el Vector pGEM-T Easy Vector de Promega	21
5.1.5. Transformación en <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	22
5.2. Clonación del gen en el vector de expresión	22
5.2.1. Reacción de ligación en el vector pQE30 de Qiagen	23
5.2.2. Desfosforilación del Vector pQE30	23

5.2.3. Ligación en el vector pQE30	24
5.2.4. Síntesis de oligonucleótidos para secuenciar en pQE30	24
5.3. Sobreexpresión de la proteína recombinante en <i>E. coli</i>	25
5.3.1. Transformación de la cepa <i>E. coli</i> XL1-Blue	25
5.3.2. Inducción con IPTG	26
5.3.3. Análisis de fracciones	26
5.4. Purificación de la proteína recombinante	27
5.4.1. Purificación de la proteína para generar anticuerpos	28
5.5. Producción de anticuerpos contra la proteína recombinante en conejo	29
5.5.1. Western blot	30
6. Resultados	32
6.1. Amplificación del gen <i>asa8</i> de <i>Polytomella sp</i> y clonación en el vector pGEM-T Easy	32
6.1.1. Alineamiento de la secuencia obtenida	34
6.2. Clonación del gen en el vector de expresión	34
6.2.1. Alineamiento de la secuencia obtenida	35
6.3. Sobreexpresión de la proteína recombinante en <i>E. coli</i>	36
6.3.1. Inducción con IPTG	36
6.3.2. Análisis de fracciones	37
6.4. Purificación de la proteína recombinante	37
6.4.1. Purificación de la proteína para generar anticuerpos	39
6.5. Producción de anticuerpos contra la proteína recombinante en conejo	40
7. Discusión	41
8. Resumen de resultados	48
9. Bibliografía	49
Apéndice A. Metodologías generales de biología molecular	55
Apéndice B. Soluciones y amortiguadores utilizados	58
Apéndice C. Cromatogramas obtenidos de la secuenciación de la clona pGEM-ASA8 B2	64

## RESUMEN

La ATP sintasa mitocondrial de las algas clorofíceas ha perdido una serie de subunidades clásicas que están involucradas en la formación del cuello lateral (estator) de la enzima y en la dimerización de la misma. En compensación, ha adquirido 9 subunidades novedosas, de origen evolutivo desconocido, que han sido llamadas ASA1 a ASA9. Algunas de estas subunidades están involucradas en la formación de un dímero estable y en la formación del estator de la enzima. En el presente trabajo, se realizó la amplificación del gen *asa8*, a partir de una genoteca de cDNAs del alga *Polytomella* sp. en el vector  $\lambda$ ZAPII, utilizando la técnica de PCR. El cDNA de la proteína de interés se clonó en el vector pGEM-T Easy y posteriormente en el vector de expresión pQE30. Se determinaron las condiciones óptimas de sobreexpresión, mediante la inducción con IPTG, de la proteína recombinante en la cepa de *E. coli* XL1-Blue. Las proteínas recombinantes, conteniendo una extensión de hexahistidinas, fueron purificadas a partir de los cuerpos de inclusión mediante tratamiento con guanidina:HCl y posteriormente por cromatografía de afinidad en columnas de níquel-ácido nitrilotriacético. Por último, se generaron anticuerpos convencionales en conejo contra la proteína recombinante los cuales reconocieron específicamente tanto a la proteína recombinante como a la subunidad ASA8 de la ATP sintasa mitocondrial aislada del alga incolora *Polytomella* sp.

## ABREVIATURAS

ASA	Proteínas Asociadas a la ATP Sintasa
BN-PAGE	Electroforesis azul nativa en gel de poliacrilamida
cDNA	ADN complementario
CoA	Coenzima A
ETF	Flavoproteína transportadora de electrones
F <sub>1</sub> F <sub>0</sub> -ATP	Complejo V (ATP sintasa)
FADH <sub>2</sub>	Dinucleótido de flavín adenina (reducido)
Fe/S	Centros hierro-azufre
FMN	Mononucleótido de flavina
IPTG	Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido
ME	Microscopía electrónica
M <sub>r</sub>	Masa molecular (Molecular ratio)
OSCP	Proteína que confiere sensibilidad a oligomicina (oligomycin-sensitivity conferring protein)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Pi	Fosfato inorgánico
Q	Ubiquinona
SDS-PAGE	Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida
X-Gal	5-Bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactósido

# 1. INTRODUCCIÓN

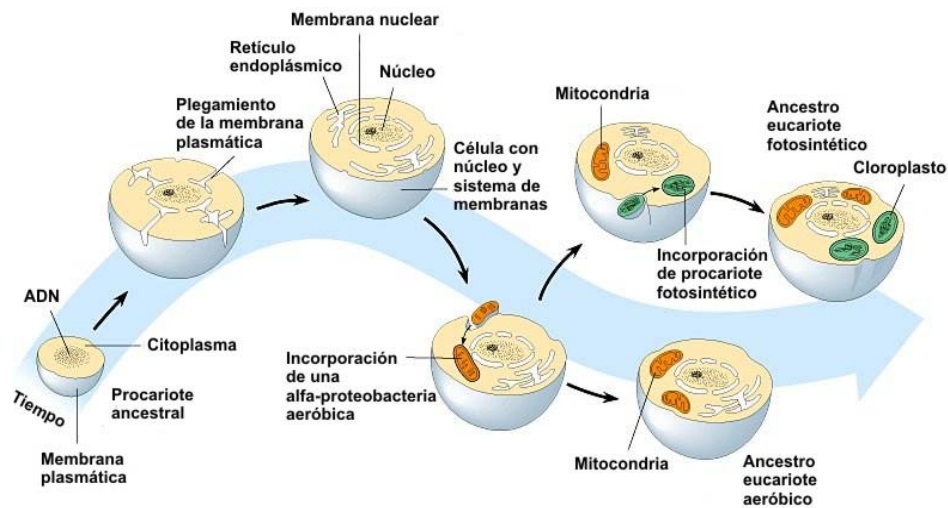
## 1.1. Las mitocondrias

Las mitocondrias son organelos que existen en gran cantidad en casi todas las células eucariotas. Generalmente hay entre 100 y 2000 mitocondrias por célula y juntas ocupan hasta el 25% del volumen celular (Koolman y Röhm, 2004). Las mitocondrias tienen una función muy importante dentro de las células eucariotas ya que son los organelos encargados de la obtención de energía celular para impulsar los procesos metabólicos mediante el ATP producido por la fosforilación oxidativa. Además de producir ATP, se relacionan con procesos de muerte celular, de envejecimiento y con diversos procesos patológicos. Las mitocondrias y los cloroplastos son los únicos organelos capaces de llevar a cabo las funciones esenciales de la célula, como la transformación y el almacenamiento de la energía, la replicación y la expresión de la información. Las mitocondrias tienen un genoma propio y son capaces de dividirse por fisión binaria; son uno de los componentes celulares mejor caracterizados estructural y funcionalmente. En 1890, Altman desarrolló nuevas técnicas para fijar y teñir tejidos (fucsina ácida), fue la época de las tinciones específicas que permitieron establecer la naturaleza química de algunos componentes de las mitocondrias en la célula. Posteriormente, Michaelis en 1900, introdujo la coloración supravital y estableció la capacidad óxido-reductora del organelo mediante el uso del verde Jano (Gómez-Lojero y Gutiérrez-Cirlos, 2002).

El número y la forma de las mitocondrias, así como el número de sus crestas varían mucho de un tipo celular a otro. Los tejidos con un metabolismo oxidativo muy intenso, como el músculo cardíaco el hígado, el riñón y el cerebro, tienen mitocondrias con muchas crestas. La forma de las mitocondrias dentro de un tejido varía de acuerdo con su estado funcional, es decir, son organelos plásticos y móviles (Koolman y Röhm, 2004).

## 1.2. Origen de las mitocondrias

Desde el descubrimiento de las mitocondrias, a principios del siglo XX, la idea de que éstas se encuentran relacionadas de alguna manera con las bacterias fue expresada por varios autores (Scheffler, 1999). Esto se fortaleció con el descubrimiento del ADN mitocondrial. La teoría endosimbiótica postulada por Margulis, en el año de 1967, propone que las células eucariotes en un principio fueron organismos anaerobios, carentes de mitocondrias. Debido a un aumento de los requerimientos energéticos de la célula primitiva, junto con un aumento substancial en la concentración de oxígeno atmosférico, se facilitó el establecimiento de una relación simbiótica estable entre una  $\alpha$ -proteobacteria con capacidad para realizar las reacciones de óxido-reducción acopladas a la síntesis de energía química (ATP) y una célula protoeucariote en una etapa temprana de la evolución. Esto pudo haber sucedido hace aproximadamente  $1.5 \times 10^9$  años, antes que ocurriera la divergencia evolutiva entre animales y plantas (Figura 1) (Margulis, 1970; Cárabez-Trejo y Sandoval, 2002; González-Halphen *et al.*, 2003).



**Figura 1.** Teoría endosimbiótica. El origen de las mitocondrias se estableció a partir de una endosimbiosis entre una  $\alpha$ -proteobacteria con capacidad oxidativa y una célula protoeucariote; mientras que los cloroplastos se originaron a partir del eucariote resultante y con la subsecuente incorporación de un procarionte fotosintético (cianobacteria). Modificada de <http://fig.cox.miami.edu/~cmallery/150/cells/c28x4euk-origin.jpg>

### 1.3. Estructura de las mitocondrias

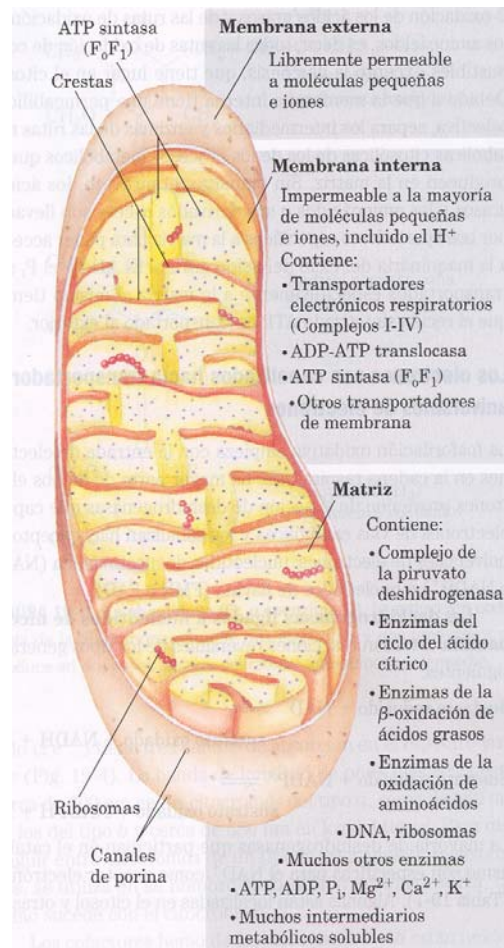
La ultraestructura de la mitocondria fue inicialmente descrita por Palade y Sjöstrand en 1952-1953. El arquetipo mitocondrial consiste en dos sacos membranales, uno inmerso en otro (Gómez-Lojero y Gutiérrez-Cirlos, 2002); mide aproximadamente  $1 \times 2 \mu\text{m}$  y es una estructura de doble membrana que forma dos compartimientos, uno externo, delimitado por ambas membranas (espacio intermembranal) y otro interno, delimitado por la membrana interna (matriz mitocondrial) (Koolman y Röhm, 2004). El aspecto de la membrana externa al microscopio electrónico corresponde al de una estructura lisa continua, mientras que la membrana interna presenta una serie de pliegues formando las crestas mitocondriales (*crístae mitocondriales*), nombre acuñado por Palade; tanto la membrana externa como la interna tienen el mismo grosor, aproximadamente  $90 \text{ \AA}$  y una estructura unitaria (Figura 2) (Cárabez-Trejo y Sandoval, 2002).

La membrana externa es fácilmente permeable a pequeñas moléculas ( $M_r < 5000$ ) e iones, los cuales se mueven libremente a través de canales transmembranales compuestos por una familia de proteínas integrales de membrana, llamadas porinas. La membrana interna es impermeable a la mayoría de las moléculas pequeñas e iones, incluido el protón ( $\text{H}^+$ ); las únicas especies que cruzan la membrana interna son aquellas para las que existen transportadores específicos (Figura 2) (Nelson y Cox, 2005).

Una diferencia importante en la composición química entre la membrana interna y la externa es que en la membrana externa el colesterol es abundante, mientras que la membrana interna contiene, de manera exclusiva, el fosfolípido cardiolipina y una pequeña cantidad de esteroides y esfingolípidos; los principales constituyentes lipídicos son la fosfatidil colina, fosfatidil inositol y fosfatidil etanolamina (Cárabez-Trejo y Sandoval, 2002; Chávez y Zazueta, 2002).

En la mitocondria se aloja la enzima inicial de la biosíntesis del grupo hemo (5-aminolevulinato sintasa) (Koolman y Röhm, 2004). En la membrana interna se alojan los complejos de la cadena respiratoria y la ATP sintasa, mientras que en la matriz mitocondrial se encuentran diversas cantidades

de enzimas solubles involucradas en el catabolismo energético, ADN mitocondrial y complejos para la replicación, transcripción y traducción de ADN (Figura 2).



**Figura 2.** Estructura general de la mitocondria. Se observa la estructura de doble membrana, definiendo los compartimientos intermembranal y matriz mitocondrial, así como algunas de las enzimas, transportadores y otros componentes localizados en ella. Tomado de Nelson y Cox (2005).

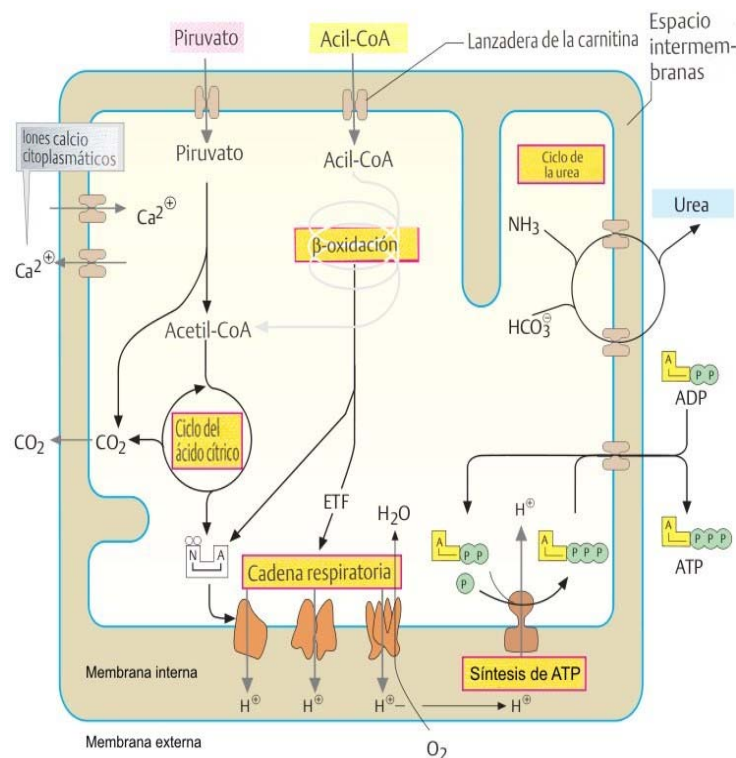
#### 1.4. Relación con el metabolismo celular

El descubrimiento de Eugene Kennedy y Alberts Lehninger en 1948 de que las mitocondrias son el sitio en donde se realiza la fosforilación oxidativa en los eucariotes marcó el inicio de la fase moderna de los estudios sobre las transducciones biológicas de energía (Nelson y Cox, 2005). La localización en



la mitocondria de las enzimas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, de la  $\beta$ -oxidación, de la oxidación de los cuerpos cetónicos y de la fosforilación oxidativa, es decir, de todas las rutas de oxidación, excepto la glucólisis, fue realizada en el periodo de 1948-1951 por Lehninger (Gómez-Lojero y Gutiérrez-Cirlos, 2002). Todos los pasos oxidativos en la degradación de glúcidos, grasas y aminoácidos convergen en esta etapa final en la que la energía de la oxidación impulsa la síntesis de ATP; así mismo en la mitocondria convergen otras rutas metabólicas como el ciclo de la urea, la biosíntesis del grupo hemo y la del ubiquinol [coenzima Q] (Figura 3) (Scheffler, 1999).

Las mitocondrias se consideran las fábricas de la célula debido a que producen la mayor parte del ATP que ésta requiere, ya que el metabolismo aeróbico es capaz de extraer alrededor de 30 moléculas de ATP por molécula de glucosa que se oxida hasta  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$ , mientras que en el metabolismo anaeróbico sólo se pueden extraer dos moléculas de ATP por molécula de glucosa (Gómez-Lojero y Gutiérrez-Cirlos, 2002). Además, Las mitocondrias junto con el retículo endoplasmático cumplen la función de almacenar calcio intracelular (Figura 3) (Koolman y Röhm, 2004).



**Figura 3.** Relación de la mitocondria con el metabolismo celular. Tomado de Koolman y Röhm (2004).

## 1.5. Cadena respiratoria y síntesis de ATP

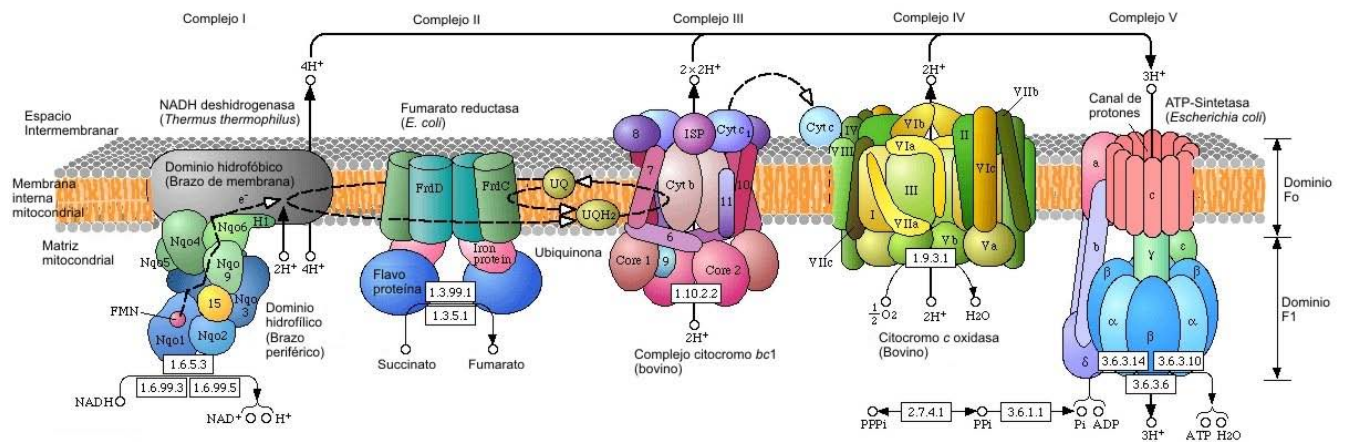
En 1938, en Dinamarca, Herman Kalkar publicó sus experimentos en los que separó el proceso glicolítico del de fosforilación asociado al transporte de electrones (Gómez-Lojero y Gutiérrez-Cirlos, 2002). El proceso de fosforilación se lleva a cabo en la mitocondria; alojados en la membrana interna mitocondrial se encuentran los cinco complejos multiproteicos que participan en este proceso: el complejo I (NADH:ubiquinona oxidoreductasa), el complejo II (succinato:ubiquinona oxidoreductasa), el complejo III (ubiquinol:citocromo c oxidoreductasa), el complejo IV (citocromo c oxidasa) y el complejo V (ATP sintasa). Además de estos complejos oligoméricos, dos componentes de estructura más sencilla, la ubiquinona (Q) y el citocromo *c* soluble (una hemoproteína pequeña), participan como distribuidores de electrones en la membrana y en el espacio intermembranal, respectivamente (Figura 4) (González-Halphen y Vázquez-Acevedo, 2002).

La cadena transportadora de electrones está constituida por grupos prostéticos oxidoreductores: grupos hemo, grupos hierro-azufre (Fe/S), mononucleótidos de flavina (FMN), flavín adenín dinucleótidos (FAD) y átomos de cobre, los cuales se encuentran siempre asociados a estructuras proteicas, ya sea de forma covalente o no covalente. Su función es llevar a cabo la oxidación de equivalentes reductores como NADH, succinato y FADH<sub>2</sub> provenientes del ciclo de Krebs, transportando los electrones a la molécula de O<sub>2</sub> para formar agua (González-Halphen y Vázquez-Acevedo, 2002).

Los electrones se dirigen a la cadena respiratoria por diferentes vías. En la oxidación del NADH + H<sup>+</sup> por el complejo I, llegan hasta la ubiquinona (Q) a través del FMN y de los centros Fe/S. Los electrones procedentes de la oxidación del succinato, de la acil-CoA y de otros sustratos, entran por medio de la succinato deshidrogenasa u otras deshidrogenasas mitocondriales; todos ellos son transferidos hasta la ubiquinona a través del FADH<sub>2</sub> unido a la enzima y por una flavoproteína transportadora de electrones (ETF). El anillo quinoide de la coenzima oxidada se reduce y forma la dihidroubiquinona, que a su vez transfiere los electrones al complejo III, el cual los cede al citocromo *c*, por medio de dos grupos hemo del tipo b, uno del centro Fe/S y otro del hemo c<sub>1</sub>. El citocromo *c* transporta los electrones al complejo

IV que contiene como componentes redox activos dos centros con cobre ( $\text{Cu}_A$  y  $\text{Cu}_B$ ) y los grupos hemo a y hemo  $a_3$ , a través de los cuales los electrones llegan finalmente hasta el oxígeno. Por la donación de dos electrones del  $\text{O}_2$  se produce -al menos formalmente- el anión  $\text{O}_2^-$ , que une dos protones y forma agua (Figura 4) (Koolman y Röhm, 2004). Los electrones provenientes de la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos también pueden entrar en la cadena respiratoria a través de Q (Nelson y Cox, 2005).

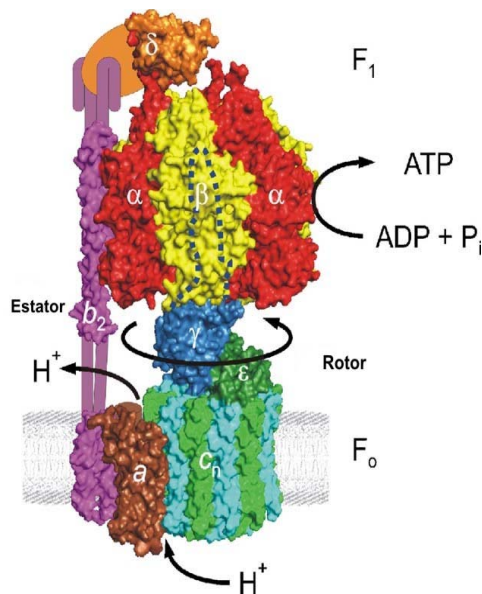
Las reacciones que llevan a cabo los complejos I, III y IV están acopladas a la translocación vectorial de protones por lo que se pueden considerar bombas de óxido-reducción, que producen un gradiente electroquímico. Por cada molécula de  $\text{H}_2\text{O}$  formada, se bombean alrededor de diez protones en el espacio intermembranar. Esto provoca que la concentración de  $\text{H}^+$  aumente en este espacio y por lo tanto el pH disminuye en un valor aproximado a una unidad (Koolman y Röhm, 2004). El modelo quimiosmótico propuesto por Mitchel en 1961 indica que la energía electroquímica inherente a la diferencia en la concentración de protones y a la separación de cargas a través de la membrana mitocondrial interna, esto es la fuerza protón-motriz, impulsa la síntesis de ATP a medida que los protones fluyen de manera pasiva a través de la ATP sintasa (Nelson y Cox, 2005, Yoshida *et al.*, 2001).



**Figura 4.** Cadena respiratoria y síntesis de ATP. La cadena respiratoria conduce los electrones a partir de la oxidación de equivalentes reductores hacia el  $\text{O}_2$ . Los complejos I, III y IV bombean protones hacia el espacio intermembranar creando un gradiente electroquímico, el cual es utilizado por el complejo V para llevar a cabo la síntesis de ATP. Modificada de <http://www.genome.jp/kegg/pathway/map/map00190.html>

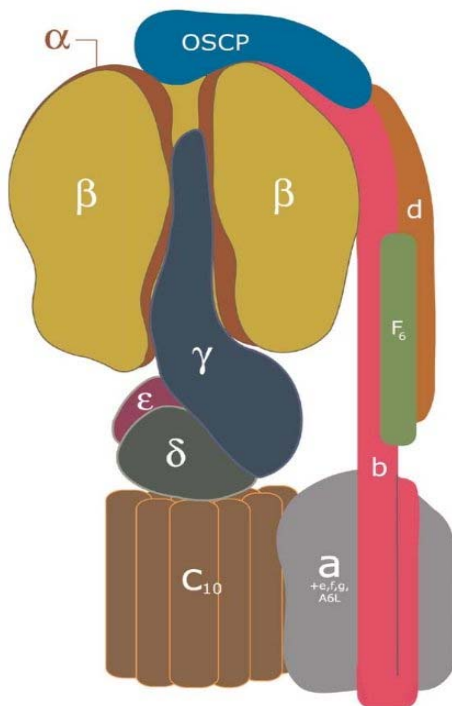
## 1.6. Complejo V (F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATP sintasa)

Las ATPasas de transporte se encuentran distribuidas a lo largo de los organismos, desde las bacterias a las células eucariotes; operan asociadas a las membranas biológicas y su propósito es movilizar diferentes tipos de iones o moléculas a través de dichas membranas utilizando la energía del ATP. Existen 4 clases de estas ATPasas: P, V, F y ABC (Pedersen, 2005). La F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP sintasa mitocondrial juega un papel preponderante en la fosforilación oxidativa. A pesar de que numerosas enzimas hidrolizan el ATP en la célula, el 90% de la síntesis en condiciones aerobias lo realiza la ATP sintasa; ésta es un complejo enzimático ampliamente distribuido en la naturaleza, se localiza en la membrana plasmática de las bacterias, en la tilacoidal de los cloroplastos y en la membrana interna mitocondrial (Domínguez-Ramírez y Tuena de Gómez-Poyou, 2005). Este complejo enzimático está constituido por dos dominios oligoméricos, un sector soluble llamado factor F<sub>1</sub> y un sector membranal denominado F<sub>0</sub> (Alfonzo *et al.*, 1981). Evolutivamente, el complejo bacteriano presenta la composición más simple, ya que consta solamente de ocho subunidades diferentes, 3 de F<sub>0</sub>: a, b<sub>2</sub> y c<sub>(10-15)</sub> y 5 subunidades diferentes de F<sub>1</sub>: alfa<sub>3</sub>, beta<sub>3</sub>, gamma, delta y épsilon (Figura 5).



**Figura 5.** Representación de la ATP sintasa de *Escherichia coli*. Se observan las subunidades de F<sub>0</sub>: a, b<sub>2</sub> y el anillo de c y las subunidades de F<sub>1</sub>: alfa<sub>3</sub>, beta<sub>3</sub>, gamma, delta y épsilon. Modificada de Weber (2006).

El complejo  $F_1F_0$ -ATP sintasa mitocondrial es uno de los nanomotores rotatorios más espectaculares descritos hasta ahora; está formado mecánicamente por dos rotores, en  $F_1$  las subunidades  $\gamma$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$  (subunidades de mitocondria de corazón de bovino) giran acordes con el segundo rotor en  $F_0$  formado por el polímero de subunidades  $c$  (Domínguez-Ramírez y Tuena de Gómez-Puyou , 2005). Otras subunidades constituyen los elementos fijos del motor (el estator): la subunidad  $a$ , el centro catalítico [ $\alpha_3/\beta_3$ ] y el pilar periférico [OSCP/  $b/d/F_6$ ] y las subunidades supernumerarias [A6L/e/f/g] (Golden y Pedersen, 1998; Ko *et al.*, 2000; Walker y Dickson, 2006). Algunas de estas subunidades están involucradas en la estabilización del complejo dimérico, tales como las subunidades  $e$  y  $g$  (Figura 6) (Brunner *et al.*, 2002; Fronzes *et al.*, 2006). Las subunidades adicionales juegan un papel regulatorio, tal es el caso de la proteína inhibidora  $IF_1$  (Gledhill y Walker, 2005).

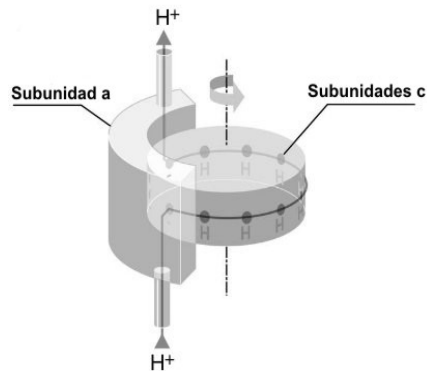


**Figura 6.** Esquema del Complejo V mitocondrial. Se enumeran las subunidades del rotor central:  $\gamma$ ,  $\delta$ , y  $\epsilon$  que gira conforme al anillo de subunidades  $c$ ; del estator: la subunidad  $a$ , el centro catalítico [ $\alpha_3/\beta_3$ ], el pilar periférico [OSCP/ $b/d/F_6$ ] y las subunidades supernumerarias [A6L/e/f/g]. Tomado de Walker y Dickson (2006).

## 1.7. Síntesis de ATP

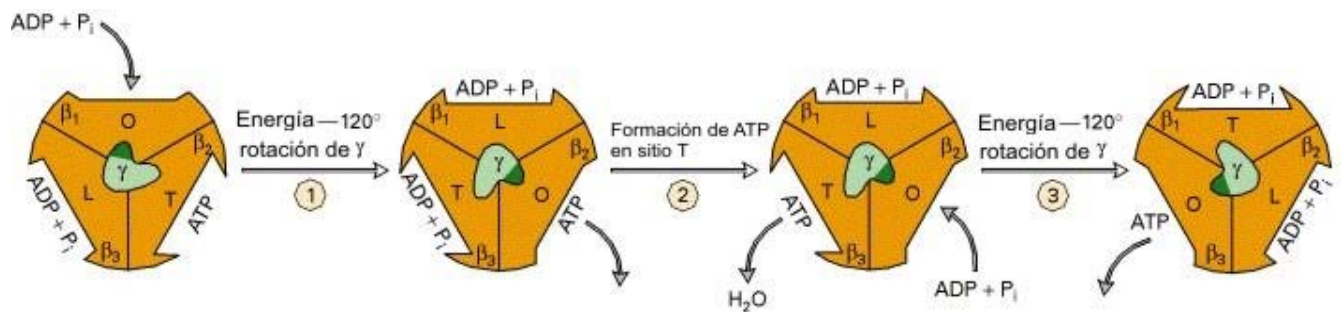
Existen seis sitios potenciales de unión de nucleótidos en el dominio  $F_1$ : tres sitios no catalíticos en las subunidades alfa y tres sitios catalíticos principalmente en la subunidad beta (Boyer, 1997). La estructura de los segmentos catalíticos muestra un alto grado de conservación en la filogenia con un 72% de identidad entre las subunidades de mayor masa molecular de las mitocondrias de bovino y la enzima de *Escherichia coli* (Domínguez-Ramírez y Tuena de Gómez-Poyou, 2005).

El flujo de protones generado por la cadena respiratoria a través de la subunidad  $a$  ocasiona el movimiento rotatorio del anillo de subunidades  $c$ . En el mecanismo propuesto por Junge en 1997 los protones pasan a través de un hemicanal formado por las subunidades  $c$ , lo que produce la rotación del anillo de subunidades  $c$  embebido en la membrana y, concomitantemente, el del cuello central [ $\gamma$  /  $\delta$  /  $\epsilon$ ] (Figura 7) (Stock *et al.*, 2000).



**Figura 7.** Mecanismo propuesto por Junge, en 1997, para la traslocación de protones. Los protones fluyen a través de la subunidad  $a$  y el hemicanal formado por las subunidades  $c$ , lo que produce la rotación de las subunidades  $c$ . Modificado de Stock *et al.* (2000).

En un ciclo completo, tres movimientos secuenciales de  $120^\circ$  de la subunidad  $\gamma$  inducen cambios conformacionales consecutivos en las tres subunidades catalíticas beta, originando la unión de sustratos ( $ADP + P_i$ ), la síntesis de ATP, y la liberación del ATP recién sintetizado al medio (Figura 8) (Itoh *et al.*, 2004).



**Figura 8.** Síntesis de ATP. La rotación de la subunidad  $\gamma$  induce cambios conformacionales en la subunidad catalítica  $\beta$ , llevando a cabo la síntesis de ATP. Modificado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bookres.fcgi/mcb/ch16f30.gif>

## 1.8. Algas clorofíceas

Las algas verdes (Chlorophyta) viven en ambientes marinos costeros formando parte del plancton o sujetas al fondo (bentos). También son abundantes en agua dulce, en lagos y ríos, en ambientes terrestres (rocas, lodos, troncos de árboles) y algunas son capaces de vivir en ambientes extremos (montañas y nieve). Actualmente se considera que las algas verdes evolucionaron en dos grandes linajes o clados. Uno de ellos, el clado clorofíceo (= clado UTC; ulvofíceas, trebouxiofíceas y clorofíceas) y el clado charofíceo (= clado C, charofíceas). El primero incluye flagelados unicelulares (*Chlamydomonas*) y colonias (*Volvox*), formas filamentosas ramificadas o no ramificadas, algas macroscópicas marinas (*Ulva*, *Codium*), algas del suelo (*Chlorella*), epífitos terrestres (*Trentopohlia*) y ficobiontes (*Trebouxia*), mientras que el segundo contiene desde organismos unicelulares (*Micrasterias*), filamentos (*Spirogyra*) hasta talos complejos parenquimatosos (*Chara*). Las algas verdes de este clado (charofíceas) son las que presentan mayor número de caracteres compartidos con los embriófitos (plantas terrestres), y derivan del mismo linaje ancestral que los briófitos y plantas vasculares (Cubas, 2008).

*Chlamydomonas* es un género de algas verdes unicelulares, que se encuentran distribuidas ampliamente en el mundo, en suelos, aguas dulces, océanos e incluso en la nieve. Las algas de este género tienen pared celular, cloroplastos y dos flagelos anteriores. Se han descrito más de 500 especies diferentes. La más utilizada en la experimentación de laboratorio es *Chlamydomonas reinhardtii*, constituida por células haploides. Puede crecer en medios simples de sales inorgánicas, utilizando la fotosíntesis como



proveedora de energía. Sin embargo, también puede crecer en oscuridad, con acetato como fuente alterna de carbono. Cuando hay ausencia de fuente de nitrógeno, las células haploides de tipo opuesto se fusionan formando una zigospora diploide que forma una pared muy gruesa para protegerse de las condiciones adversas. Cuando estas condiciones mejoran, el cigoto diploide se separa mediante meiosis, liberando 4 células haploides que continúan con vida vegetativa (<http://www.chlamy.org>). Se cuenta con la secuencia completa del genoma nuclear, cloroplastídico y mitocondrial de *C. reinhardtii* (Smith y Lee, 2008).

Algunas algas incoloras están relacionadas con las algas verdes dado que comparten características morfológicas y etapas en el ciclo de vida. Un ejemplo es el alga *Polytomella sp* que se encuentra relacionada con *C. reinhardtii* (Figura 9); ambos géneros han reducido el tamaño de su secuencia de ADN mitocondrial, que codifica para un número limitado de proteínas de la cadena respiratoria. *Polytomella* es un alga unicelular, de forma ovoide, con cuatro flagelos; es incolora ya que carece de cloroplastos, lo que permite un mejor estudio de la estructura mitocondrial y, al igual que *C. reinhardtii*, tiende a enquistarse en condiciones desfavorables del medio.



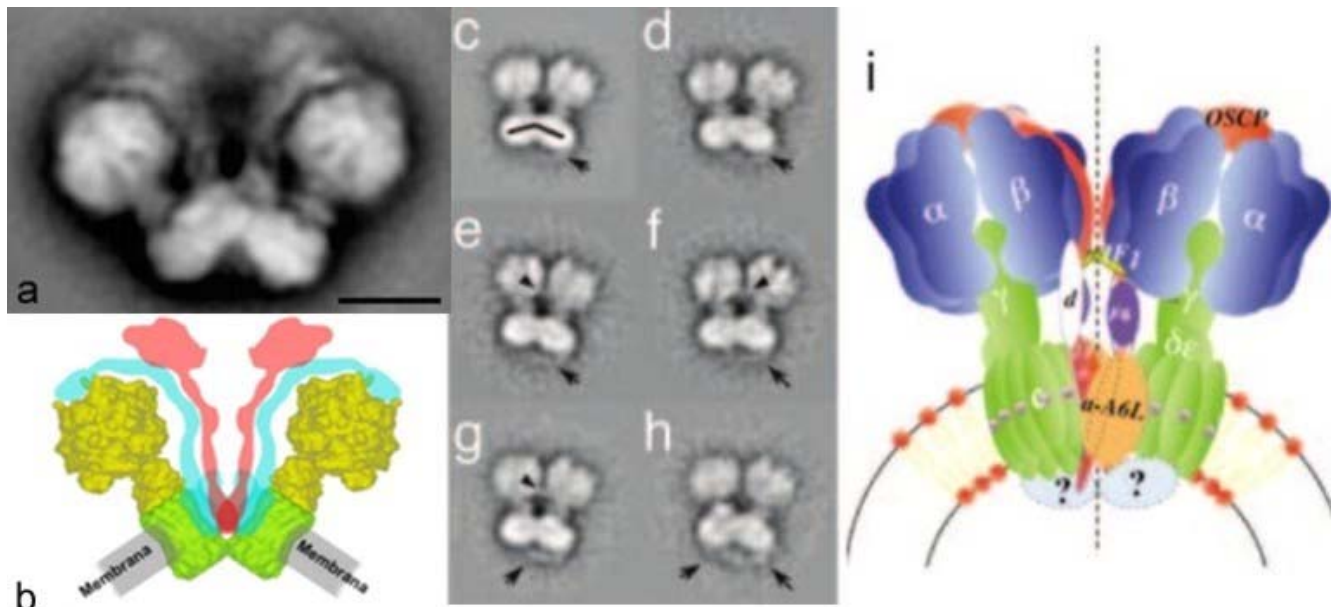
**Figura 9.** *C. reinhardtii* y *Polytomella sp*. La primera es un alga fotosintética, mientras que la segunda es un alga incolora, Ambos géneros pertenecen a la familia Chlamydomonadaceae.

[http://bp1.blogger.com/\\_DZH2cmCoois/Rw-OYR\\_zsKI/AAAAAAAAADaM/LtXdx\\_Wo3W4/s1600-h/chlamydomonas.jpg](http://bp1.blogger.com/_DZH2cmCoois/Rw-OYR_zsKI/AAAAAAAAADaM/LtXdx_Wo3W4/s1600-h/chlamydomonas.jpg) y <http://128.128.175.211/fedora/get/data:288628/LocalImage>



## 1.9. Dimerización y subunidades ASA

En comparación con otras  $F_1F_0$ -ATPasa, la ATP sintasa de las algas clorofíceas *Chlamydomonas reinhardtii* y *Polytomella* sp. presenta una estructura diferente a la del resto de los eucariotes, ya que en primer lugar migra en geles BN-PAGE como dímeros estables de 1,600 kDa (van Lis *et al.*, 2003; van Lis *et al.*, 2005; Dudkina *et al.*, 2005). Aunque se postula que la ATP sintasa es dimérica *in vivo* (Schägger, 2002), el complejo V mitocondrial de diversos organismos como hongos, plantas y mamíferos suele migrar como un monómero de 550 a 600 kDa en geles azules nativos (BN-PAGE) (Schägger, 1994). A partir de un estudio de microscopía electrónica (ME), se observó que el dímero del complejo V de *Polytomella* sp presenta una forma distinta al dímero aislado a partir de mitocondrias de bovino (Figura 10) (Dudkina *et al.*, 2005; Dudkina *et al.*, 2006; Minauro-Sanmiguel *et al.*, 2005).



**Figura 10.** Dímero de ATP sintasa de *Polytomella* sp y de bovino. (a) Microscopía electrónica (ME) del dímero de  $F_1F_0$ -ATPasa de *Polytomella* sp, se observa la robustez del pilar periférico; (b) esquema del dímero de *Polytomella* sp; (c-h) ME del dímero aislado de mitocondrias de bovino, se observa un pilar periférico pequeño; (i) esquema del dímero de ATP sintasa de bovino. Modificado de Dudkina *et al.* (2005) y Minauro-Sanmiguel *et al.* (2005).

A partir de diversos estudios, se encontró que la ATP sintasa de *C. reinhardtii* contiene 14 subunidades, con masas moleculares entre 7 y 60 kDa (van Lis *et al.*, 2003, Funes *et al.*, 2002, Cardol *et al.*, 2005). También contienen extensiones en el extremo amino terminal de la subunidad alfa de aproximadamente 20

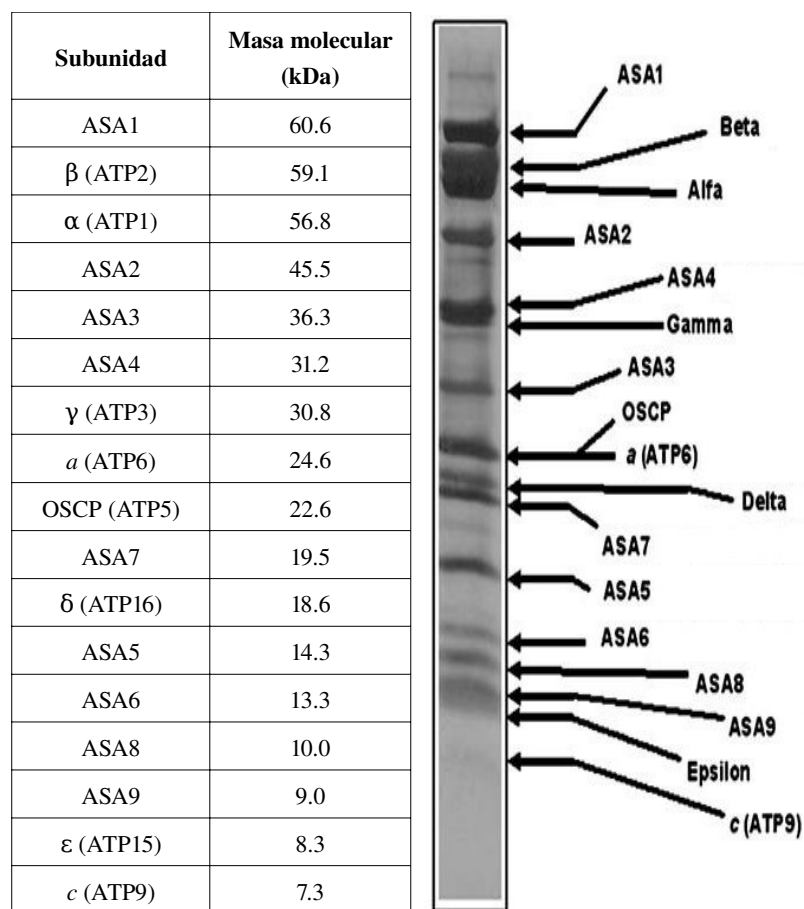
residuos, así como otra en el extremo carboxilo terminal de la subunidad beta con cerca de 64 aminoácidos (Figura 11) (Franzén y Falk, 1992; Nurani y Franzén, 1996).



Figura 11. Modelo del sector F<sub>1</sub> de *C. reinhardtii*. Modelo realizado en robetta (<http://robetta.bakerlab.org/>) con base en las secuencias reportadas para alfa y beta (Franzén y Falk, 1992; Nurani y Franzén, 1996) modeladas sobre las coordenadas cristalográficas de la enzima de bovino.

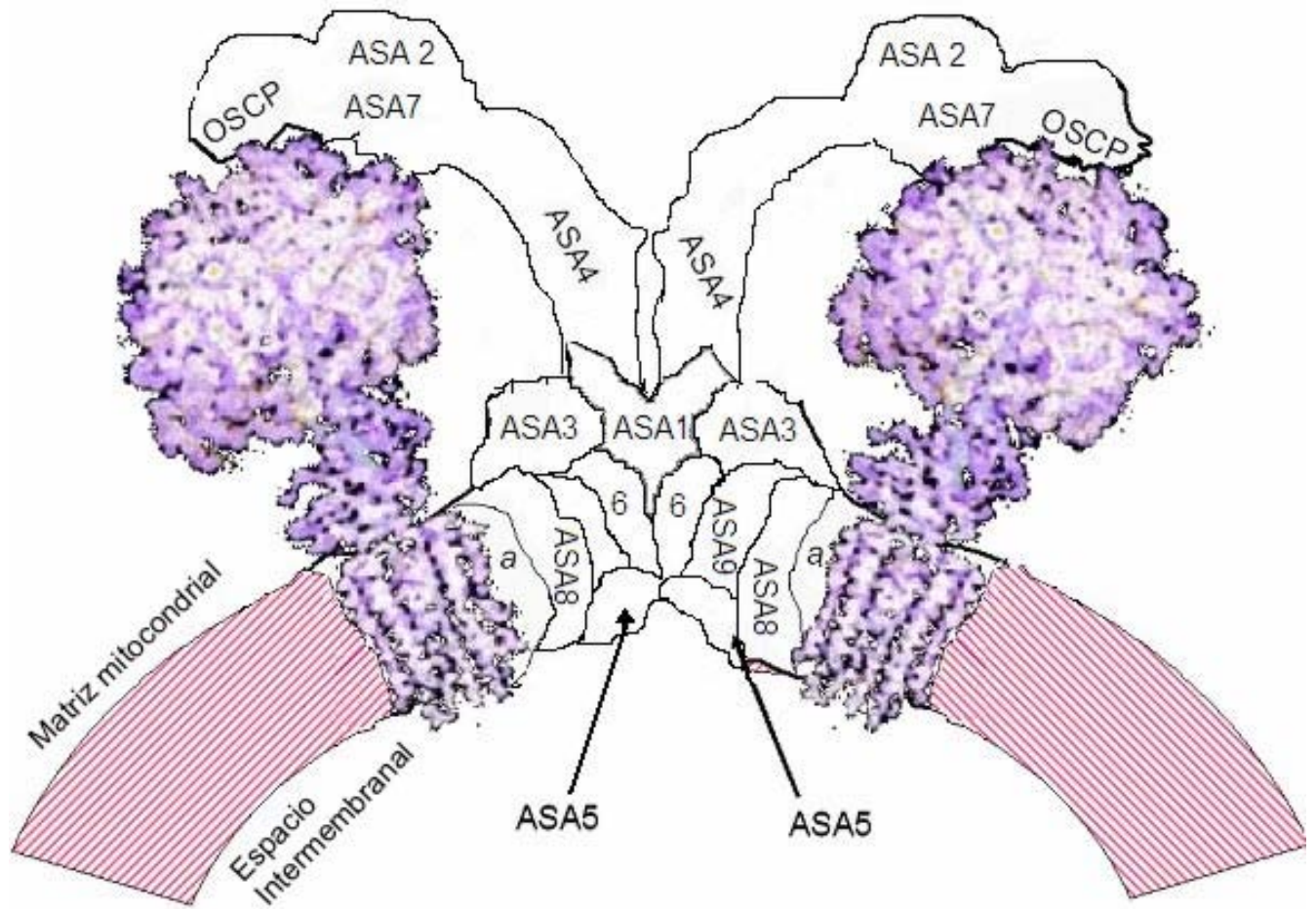
Siete de las subunidades codificadas en el genoma de *Chlamydomonas* son las subunidades clásicas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ , *a* (ATP6), *c* (ATP9), y OSCP. Sin embargo, no se han detectado homólogos de las subunidades  $\epsilon$ , *b*, *d*, *e*, *f*, *g*, IF<sub>1</sub>, A6L, y F6. Por el contrario, se identificaron siete nuevos polipéptidos, los cuales reciben el nombre de subunidades ASA (por las siglas en inglés correspondientes a proteínas asociadas a la ATP sintasa), numeradas sucesivamente como ASA1, ASA2, ASA3, ASA4, ASA5, ASA6, y ASA7, de acuerdo con la nomenclatura del genoma de *C. reinhardtii*. Estas nuevas subunidades no tienen homólogos en los bancos de datos, lo que sugiere que ciertas proteínas atípicas están asociadas con la ATP sintasa mitocondrial de las algas clorofíceas (Cardol *et al.*, 2005).

La composición polipeptídica del complejo V del alga incolora *Polytomella* sp. es muy similar a la de *C. reinhardtii*. Además se encontró la subunidad épsilon y dos nuevas subunidades ASA8 y ASA9. Esta ATP sintasa atípica tiene un patrón electroforético característico en geles SDS-PAGE (Figura 12) (Vázquez-Acevedo *et al.*, 2006).



**Figura 12.** Composición peptídica de la  $F_1F_0$ -ATPasa mitocondrial de *Polytomella sp* y su patrón electroforético en un gel SDS-PAGE. Las masas moleculares se calcularon a partir de la secuencia de la proteína madura de *C. reinhardtii*. Modificado de Vázquez-Acevedo *et al.* (2006). El dato de ASA9 se tomó de van Lis *et al.* (2007).

Las subunidades ASA solamente están presentes en el grupo de las algas clorofíceas y no se encuentran en otras algas cercanamente relacionadas, como las ulvofíceas, las prasinofíceas y las trebuxiofíceas (Vázquez-Acevedo *et al.*, 2006). Experimentos de disociación por altas temperaturas y de tratamiento de la enzima con agentes entrecruzadores llevaron a la propuesta de un modelo estructural de la ATP sintasa de las algas clorofíceas, donde se propone que las subunidades ASA1 a 9 participan en la estructura del segundo cuello periférico (estator) y en la dimerización de la enzima (Figura 13) (Vázquez-Acevedo *et al.*, 2006; Cano-Estrada, 2007).



**Figura 13.** Modelo de la estructura dimérica de la F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPasa mitocondrial de *Polytomella sp.* Modificado de Cano-Estrada (2007).

## 2. JUSTIFICACIÓN

Para poder llevar a cabo estudios más profundos sobre la estructura de la ATP sintasa mitocondrial de algas clorofíceas es necesario generar anticuerpos contra las diferentes subunidades del complejo.

En el laboratorio 324 norte del Instituto de Fisiología Celular (UNAM) se han obtenido anticuerpos convencionales contra las subunidades de alta masa molecular, como  $\alpha$ ,  $\beta$ , ASA1, ASA2, ASA3 y ASA4; sin embargo, ha sido difícil obtener anticuerpos contra las subunidades de baja masa molecular. Una alternativa es generar anticuerpos a partir de proteínas recombinantes.

## 3. OBJETIVOS

Clonar el cDNA del gen que codifica para la subunidad ASA8 de la  $F_1F_0$ -ATPasa mitocondrial del alga incolora *Polytomella sp.*

Expresar la proteína ASA8 en *Escherichia coli* y purificar la subunidad resultante con el fin de generar anticuerpos específicos contra dicha subunidad.

#### 4. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Se amplificó por PCR el cDNA de la subunidad ASA8 a partir de una genoteca de cDNA de *Polytomella* sp. El producto amplificado se clonó en vectores de replicación y de expresión en bacterias. La proteína se expresó en *Escherichia coli* cepa XL1-Blue mediante la inducción con IPTG. La proteína recombinante, conteniendo extensiones de hexahistidinas, se purificó mediante cromatografía de afinidad en columnas de níquel-ácido nitrilotriacético. Se generaron anticuerpos específicos contra dicha subunidad. Esta secuencia se muestra en la Figura 14.

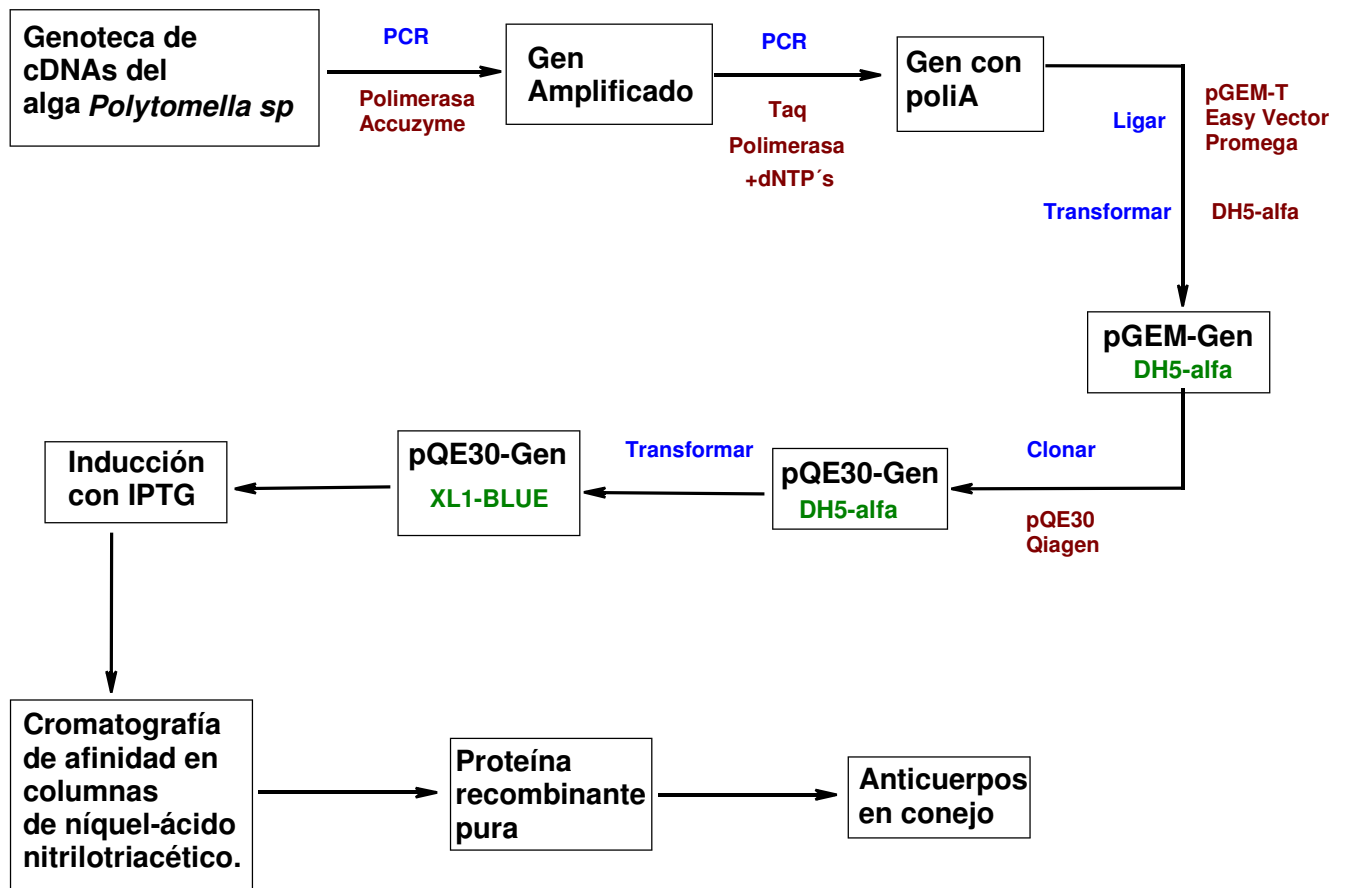


Figura 14. Secuencia experimental para generar los anticuerpos en conejo a partir de la genoteca de *Polytomella* sp.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

Todas las centrifugaciones fueron realizadas en una centrífuga Sorvall RC5BPlus con un rotor FIBERLite F21-8x50 y en caso de muestras pequeñas (>1.5 mL) en una microcentrifuga Eppendorf MiniSpinPlus.

### 5.1. Amplificación del gen *asa8* de *Polytomella sp* y clonación en el vector pGEM-T Easy

#### 5.1.1. Diseño de oligonucleótidos

Con base en la secuencia del gen *asa8* de *Polytomella sp* se diseñaron los oligonucleótidos para amplificación por PCR.

ASA8 Forward: (5'-3') BamHI y NheI

GCGGGATCCGCTAGCATGGTCCTCGGTGAGGTCTAC (Tm 70.3°C)

ASA8 Reverse: (5'-3') HindIII

GCGAAGCTT TAGTGACCACCAGCAGTGTAAG (Tm 63.6°C)

#### 5.1.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La amplificación por PCR del gen se realizó a partir de una genoteca de cDNA del alga *Polytomella sp* utilizando el Qiagen *Taq* PCR kit, sustituyendo la *Taq* polimerasa incluida por la ACCUZYME DNA Polymerase de Boline (Cuadro 1).

**Cuadro 1.** Mezcla de reacción para la amplificación del gen *asa8*

	Volumen (μL)
Genoteca	2
ASA8-F (305 μg/μL)	2
ASA8-R (250 μg/μL)	2
Amortiguador PCR10X (15 mM MgCl <sub>2</sub> )	5
Amortiguador Q	10
dNTPs(10 mM cada uno)	2
Polimerasa (2.5 U/μL)	0.5
H <sub>2</sub> O	26.5



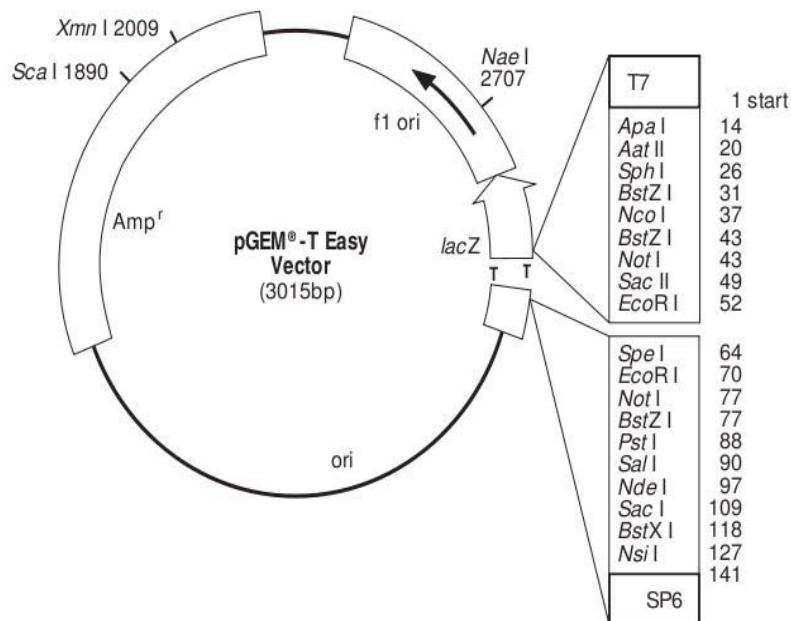
Se experimentó con diferentes temperaturas de alineamiento, número y duración de los ciclos, y se determinaron las condiciones óptimas para una buena amplificación (Cuadro 2).

**Cuadro 2.** Condiciones de amplificación para el gen *asa8* a partir de la genoteca de cDNA de *Polytomella sp*

Proceso	Temperatura (°C)	Duración (min)	No. de repeticiones
Desnaturalización	94	3	1
Desnaturalización	94	1	40
Alineamiento	50	2	
Elongación	72	2	
Elongación	72	10	1

### 5.1.3. Adición de adenina al extremo del producto de PCR

El vector pGEM-T Easy está especialmente diseñado para la ligación de productos de PCR (Figura 15). Contiene extremos de timinas en el centro del sitio múltiple de clonación, por lo que para un mejor rendimiento en la ligación es conveniente que el producto de PCR contenga nucleótidos de adenina en ambos extremos de la cadena.



**Figura 15.** Esquema del pGEM-T Easy Vector de Promega  
Tomado de [www.promega.com/tbs/tm042/tm042.pdf](http://www.promega.com/tbs/tm042/tm042.pdf)



El producto se separó en un gel de agarosa al 1% en amortiguador TAE y se observó la banda de aproximadamente 300 pb que fue purificada con el Qiagen QIAquick Gel Extraction Kit (Apéndice A). Posteriormente, se realizó la adición de un nucleótido adenina en ambos extremos de la cadena utilizando el Qiagen *Taq* PCR kit.

---

**Cuadro 3.** Mezcla de reacción para la adición de adenina utilizando el Qiagen *Taq* PCR Kit

---

	Volumen (μL)
Amortiguador PCR10X (15 mM MgCl <sub>2</sub> )	5
Amortiguador Q	10
dNTPs (10 mM cada uno)	1
Taq (5 U/μL)	0.5
H <sub>2</sub> O	5.5

La reacción se llevó a cabo a 72 °C durante 30 min. El producto de la reacción fue purificado con el Qiagen QIAquick PCR Purification Kit (Apéndice A) y ligado en el vector pGEM-T Easy Vector de Promega.

#### 5.1.4. Ligación en el Vector pGEM-T Easy Vector de Promega

Una vez purificado el producto de PCR, se midió su concentración utilizando un espectrofotómetro Thermo Scientific NanoDrop 1000; se obtuvo una concentración de 95 ng/μL y con base en ésta se calculó el volumen a utilizar para la reacción de ligación, la que se incubó toda la noche a 16°C.

---

**Cuadro 4.** Mezcla de reacción para la ligación en el vector pGEM-T Easy de Promega

---

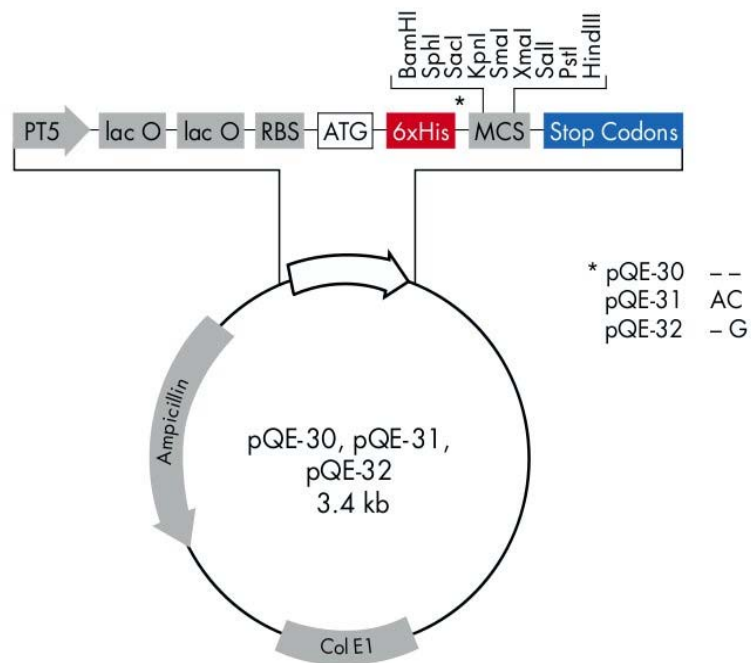
	Volumen (μL)
Amortiguador de ligación 2X	5
pGEM-T Easy Vector (50 ng/μL)	1
DNA (95 ng/μL)	0.5
T4 DNA ligasa (3 U/μL)	1
H <sub>2</sub> O	2.5

### 5.1.5. Transformación en *E. coli* DH5 $\alpha$

Una vez ligado en el vector pGEM, el producto se utilizó para transformar la cepa *E. coli* DH5 $\alpha$  utilizando ampicilina a 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  como marcador de selección (Apéndice A); se sembró en cajas Petri con medio LB + IPTG y X-Gal para diferenciar las colonias que tuvieran presente el inserto en el vector de las que sólo adquirieron el vector.

### 5.2. Clonación del gen en el vector de expresión

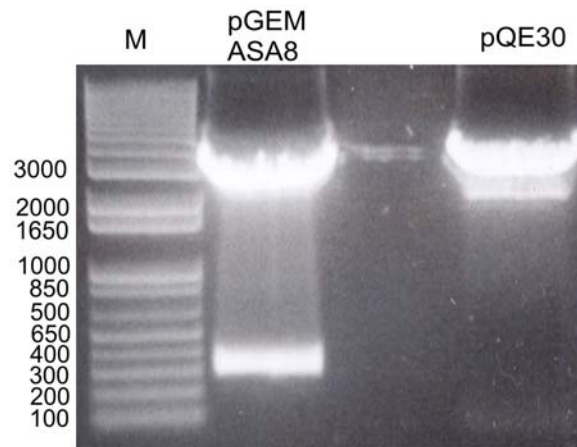
El sistema de expresión utilizado fue el pQE30 Vector de Qiagen (Figura 16). Este plásmido permite la expresión de proteínas recombinantes en *E. coli* mediante la inducción con IPTG; además la proteína recombinante adquiere una etiqueta de 6 histidinas (His-tag) que permiten una purificación de la proteína recombinante mediante columnas de Ni<sup>2+</sup>-ácido nitriloacético.



**Figura 16.** Esquema del sistema pQE30, pQE31 y pQE32 de Qiagen.  
Tomado de [www1.qiagen.com/literature/pqesequences/pqe3x.pdf](http://www1.qiagen.com/literature/pqesequences/pqe3x.pdf)

### 5.2.1. Reacción de ligación en el vector pQE30 de Qiagen

Una vez que se confirmó la secuencia obtenida del gen, se realizó una restricción secuencial con las enzimas BamHI y HindIII del vector pQE30 y de la construcción pGEM-ASA8 para liberar el inserto (Apéndice A). El producto de las reacciones se corrió en un gel de agarosa 1% en amortiguador TAE para visualizar los fragmentos cortados (Figura 17).



**Figura 17.** Restricciones de la construcción pGEM-ASA8 y del vector pQE30 con las enzimas BamHI y HindIII.

Ambos fragmentos de interés (pQE30 cortado y ASA8 liberado) se purificaron a partir de la banda del gel (Qiagen QIAquick Gel Extraction Kit).

### 5.2.2. Desfosforilación del Vector pQE30

Una vez cortado y purificado, el vector pQE30 se llevó a cabo una reacción de desfosforilación con la enzima fosfatasa alcalina (Roche), con el fin de evitar la religación del vector solo.

**Cuadro 5.** Mezcla de reacción para desfosforilar el vector pQE30

	Volumen ( $\mu\text{L}$ )
Amortiguador 10X	3.2
DNA	28
Fosfatasa alcalina (3 U/ $\mu\text{L}$ )	1

Se incubó a 37 °C durante 20 min y posteriormente se purificó con el sistema Qiagen QIAquick PCR Purification para posteriormente poder llevar a cabo la ligación.

### 5.2.3. Ligación en el vector pQE30

Para la ligación se utilizó la enzima T4 DNA ligasa de Invitrogen (Cuadro 6). La reacción se incubó a 16 °C toda la noche.

**Cuadro 6.** Mezcla de reacción para la ligación en el vector pQE30

	Volumen (μL)
Amortiguador de ligación 10X	2.8
pQE30 (153 ng/μL)	8
ASA8 (21 ng/μL)	16
T4 DNA ligasa (3 U/μL)	1

Posteriormente, se transformó la cepa *E. coli* DH5α para guardar la construcción y replicar el plásmido utilizando ampicilina a 100 μg/mL como marcador de selección.

### 5.2.4. Síntesis de oligonucleótidos para secuenciar en pQE30

Con base en las secuencias utilizadas por Steven *et al.* (2006), se diseñaron los oligonucleótidos para secuenciación en el vector pQE30.

pQE-promoter region sequencing primer (5'–3')

CCCGAAAAGTGCCACCTG

T<sub>m</sub> 56.7 °C

pQE-reverse sequencing primer

GTTCTGAGGTCATTACTGG

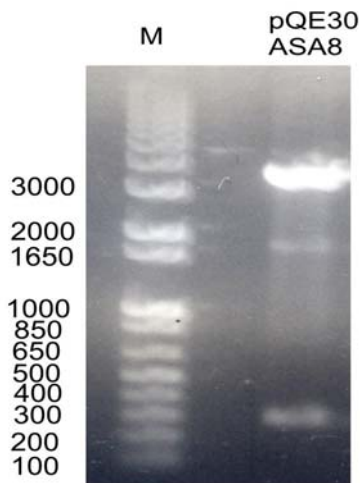
T<sub>m</sub> 49.8°C

### 5.3. Sobreexpresión de la proteína recombinante en *E. coli*

#### 5.3.1. Transformación de la cepa *E. coli* XL1-Blue

Una vez que se confirmó la secuencia del gen en el vector pQE30, éste se utilizó para transformar la cepa *E. coli* XL1-Blue, utilizando ampicilina (100 µg/mL) y tetraciclina (40 µg/mL) como marcadores de selección, ya que la cepa XL1-Blue presenta resistencia a tetraciclina.

Se realizó una preparación de ADN por columna de Qiagen (Apéndice A) con una de las colonias transformantes y se realizó una restricción secuencial, inicialmente con la enzima HindIII y posteriormente con BamHI, para visualizar el inserto (Figura 18). Se seleccionó esa clona para llevar a cabo la sobreexpresión por inducción con IPTG.



**Figura 18.** Restricción secuencial del ADN plasmídico de la clona transformante XL1-Blue con las enzimas BamHI y HindIII.

Se desarrolló un cultivo de 5 mL de medio LB adicionado con ampicilina y tetraciclina hasta alcanzar una densidad óptica de 0.5 a  $\lambda$  de 600 nm; se tomaron alícuotas de 800 µL y se agregaron 200 µL de glicerol estéril para guardar la clona a -70 °C y utilizarla como cultivo de inicio en ocasiones posteriores.

### **5.3.2. Inducción con IPTG**

Para los experimentos de inducción se inocularon 3 mL de medio LB adicionado con ampicilina y tetraciclina con 3  $\mu$ L de los gliceroles iniciales en 6 tubos Falcon de 15 mL; adicionalmente 2 tubos Falcon con 3 mL de medio LB adicionado con tetraciclina, se inocularon con la cepa XL1-Blue como controles negativos; todos los tubos se incubaron a 37 °C, 250 rpm, durante 18 h. Una vez transcurrido el tiempo se transfirió el cultivo a un tubo Falcon de 50 mL y se agregó IPTG a una concentración final de 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1 y 2 mM para los tubos con la construcción y 0.1 mM a los tubos controles.

Todos los tubos se incubaron durante 6 h a 37 °C y 250 rpm. Transcurrido este tiempo se tomaron alícuotas de 200  $\mu$ L de cada tubo, se centrifugaron durante 2 min a 5000 rpm para sedimentar las células y se mantuvieron a 4 °C.

A las muestras se les agregaron 10  $\mu$ L de solución digestora, calentando a 50 °C durante 2 min y se analizaron por SDS-PAGE de von Jagow (Apéndice B). Los geles fueron teñidos con azul de Comassie.

### **5.3.3. Análisis de fracciones**

Para ubicar la localización de la proteína recombinante se realizó el análisis de las fracciones obtenidas luego de la sonicación. Para esto, se inoculó un volumen de 20 mL de medio LB, adicionado con ampicilina y tetraciclina, con 10  $\mu$ L de los gliceroles iniciales y se incubaron a 37 °C, 250 rpm, durante 18 h. Una vez transcurrido el tiempo se transfirió el cultivo a un matraz Erlenmeyer estéril de 250 mL y se agregó IPTG a una concentración final de 0.1 mM y se incubó a 37 °C, 250 rpm durante 6 h. Enseguida se realizó la ruptura de las células por sonicación como se describe a continuación.

- 1) Se centrifugó el cultivo a 6000 rpm durante 10 min para bajar las células
- 2) Se resuspendió el botón en 15 mL de PBS
- 3) Se agregaron 10  $\mu$ L de solución de PMSF 0.1 M como inhibidor de proteasas
- 4) Se sonicó a 50 % a una potencia de 3 watts en pulsos de 1 min
- 5) Se repitió dos veces el paso 4 dejando enfriar el sonicador durante 1 min
- 6) Se tomaron alícuotas de 100 y 200  $\mu$ L del cultivo sonicado y centrifugar a 5000 rpm durante 10 min

- 7) Se separó el botón y el sobrenadante
- 8) Se tomaron alicuotas de 100 y 200  $\mu\text{L}$  del cultivo sonicado y se centrifugó a 10000 rpm durante 10 min
- 9) Se separaron el botón y el sobrenadante

A partir de las muestras tomadas se precipitaron las proteínas presentes en fracción del sobrenadante como se describe a continuación.

- 1) Se agregaron 400  $\mu\text{L}$  de MeOH y se agitó en vórtex
- 2) Se agregaron 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{CHCl}_3$  y se agitó en vórtex
- 3) Se agregaron 300  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  y se agitó en vórtex
- 4) Se centrifugó a 14000 rpm durante 5 min
- 5) Se retiró la fase acuosa y orgánica con mucho cuidado (las proteínas precipitadas se encontraron en la interfase)
- 6) Se agregaron 300  $\mu\text{L}$  de MeOH y se agitó en vórtex
- 7) Se centrifugó a 14000 rpm durante 5 min
- 8) Se retiró el MeOH
- 9) Se dejó secar al aire

A todas las muestras tomadas se les agregaron 10  $\mu\text{L}$  de solución digestora y se analizaron en geles SDS-PAGE.

#### **5.4. Purificación de la proteína recombinante**

Debido a que la mayoría de la proteína recombinante producida en *E. coli* se encontró en cuerpos de inclusión, se llevó a cabo la purificación de la proteína a partir de éstos con el fin de obtener una buena cantidad de proteína para generar anticuerpos.

Se inoculó un volumen de 20 mL de medio LB adicionado con ampicilina y tetraciclina, con 10  $\mu\text{L}$  de los gliceroles iniciales, se incubaron a 37 °C, 250 rpm, durante 18 h. Posteriormente se transfirió el cultivo a un matraz Erlenmeyer estéril de 250 mL y se agregó IPTG a una concentración final de 0.1 mM y se incubó a 37°C, 250 rpm durante 6 h. Enseguida se realizó la sonicación con las condiciones indicadas anteriormente centrifugando toda muestra a 10000 rpm durante 10 min para concentrar los cuerpos de inclusión.

La purificación a partir de cuerpos de inclusión se realizó de la siguiente manera:

- 1) Se resuspendió el botón en 20 mL de amortiguador de guanidina 6 M
- 2) Se colocó en agitación suave toda la noche a 4 °C
- 3) Se centrifugó a 12000 rpm durante 5 min
- 4) Se recolectó el sobrenadante en un tubo nuevo
- 5) Se agregaron 1000 µL de la resina (resina de níquel unido a Sefarosa marca Amersham Biosciences)
- 6) Se adicionó imidazol a una concentración de 10 mM
- 7) Se colocó en agitación suave durante 2 h a 4 °C
- 8) Se lavó la columna con PBS
- 9) Se agregó la muestra entera a la columna y se dejó asentar la resina
- 10) Se eluyó la fase móvil\*
- 11) Se lavó la columna con 20 mL de amortiguador de guanidina 6 M adicionado con imidazol a 60 mM\*
- 12) Se prepararon 3 mL de amortiguador de guanidina 6 M adicionando imidazol a las concentraciones de 70, 80, 90, 100, 120 y 140 mM
- 13) Se eluyó la resina con cada uno de los amortiguadores preparados en el paso 12, de forma ascendente de la concentración de imidazol\*

\*Se tomó una muestra de 200 µL

A partir de cada una de las muestras tomadas se precipitaron las proteínas presentes y se analizaron por SDS-PAGE.

#### **5.4.1. Purificación de la proteína para generar anticuerpos**

Se desarrolló un cultivo de 100 mL de LB adicionado con ampicilina y tetraciclina en un matraz Erlenmeyer de 250 mL. Se utilizó un inóculo de 100 µL de los glicerolos iniciales. Se incubó a 37 °C, 250 rpm, durante 18 h. Una vez transcurrido el tiempo se transfirió el cultivo a un matraz Erlenmeyer estéril de 1000 mL y se agregó IPTG a una concentración final de 0.1 mM, se incubó a 37°C, 250 rpm durante 6 h. Inmediatamente se realizó la sonicación con las condiciones mencionadas anteriormente centrifugando toda la muestra a 10000 rpm durante 10 min para concentrar los cuerpos de inclusión.



La purificación por columna se realizó de igual manera a la descrita anteriormente, tomando en cuenta los siguientes cambios:

- 1) Se agregó imidazol a una concentración de 20 mM al momento de agregar la resina
- 2) Se realizó el lavado con un volumen de 60 mL a una concentración de 70 mM de imidazol
- 3) La elución se realizó en un volumen de 6 mL a una concentración de 120 mM de imidazol

Se tomaron alícuotas de 200  $\mu$ L del eluido, se precipitaron con MeOH/CHCl<sub>3</sub> y se corrieron en un gel desnaturizante con amortiguador cátodo con azul de Coomassie para visualizar la banda de interés.

### **5.5. Producción de anticuerpos contra la proteína recombinante en conejo**

Las bandas del gel se molieron en 4 mL de TBS, se tomaron alícuotas de 500  $\mu$ L y se guardaron a -20 °C. Se inmunizaron dos conejos hembras, de 1 kg de peso, intramuscularmente, con una mezcla de la proteína con adyuvante completo de Freund (1:1), seguida de tres refuerzos de la muestra, mezclada con 800  $\mu$ L de adyuvante incompleto de Freund cada 3 semanas.

Se tomó una muestra de sangre a la semana 12, por punción en la oreja, se dejó formar el coágulo a 4°C y se centrifugó a 15000 rpm durante 30 min. La presencia de anticuerpos fue corroborada por Western-blot contra la ATP sintasa purificada de *Polytomella sp* y contra el eluido obtenido en la sección “Purificación de la proteína para generar anticuerpos”.

Una vez corroborada la presencia de anticuerpos contra la subunidad ASA8 de *Polytomella sp* se llevó a cabo la toma de sangre a blanco de ambos conejos, se separó el suero como se describió anteriormente y se precipitó con 40% de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se hicieron alícuotas de 200  $\mu$ L y se guardaron a -70°C.

### 5.5.1. Western Blot

Se llevó a cabo la detección de anticuerpos contra la proteína recombinante mediante Western blot. Se transfirieron las proteínas separadas en el gel SDS-PAGE, a una membrana de nitrocelulosa como se describe:

- 1) Se realizó una SDS-PAGE de las proteínas de interés
- 2) Se recortaron seis trozos de papel Whatman del tamaño del gel
- 3) Se sumergieron tres trozos de papel Whatman en amortiguador positivo
- 4) Se sumergieron tres trozos de papel Whatman en amortiguador negativo
- 5) Se sumergió el gel en amortiguador negativo
- 6) Se cortó un acetato y se colocó de forma que cubriera la superficie de la cámara no usada
- 7) Se cortó un trozo de membrana de nitrocelulosa y se remojó en amortiguador positivo
- 8) Se colocó 1 trozo de papel remojado en amortiguador positivo y se expulsó el aire rodando un tubo limpio sobre la superficie
- 9) Se repitió el paso 7 con los otros dos trozos
- 10) Se colocó la membrana remojada en amortiguador positivo y se expulsó el aire
- 11) Se colocó el gel remojado en amortiguador negativo
- 12) Se colocó 1 trozo de papel remojado en amortiguador negativo y se expulsó el aire
- 13) Se repitió el paso 12 con los otros dos trozos
- 14) Se colocó la tapa en un solo movimiento
- 15) Se transfirió durante 2 h a una intensidad de  $1 \text{ mA/cm}^2$

Se verificó la transferencia de las proteínas realizando una tinción con solución de rojo de Poinceau 0.1%

- 1) Se lavó la membrana con agua por 1 minuto
- 2) Se sumergió en solución de rojo de Poinceau hasta observar las proteínas transferidas
- 3) Se destiñó con agua

Una vez verificado que las proteínas se encontraban en la membrana se efectuó la detección inmunológica. La unión de los anticuerpos producidos se detectó con un anticuerpo secundario antiIgG de conejo, conjugado con la enzima fosfatasa alcalina.

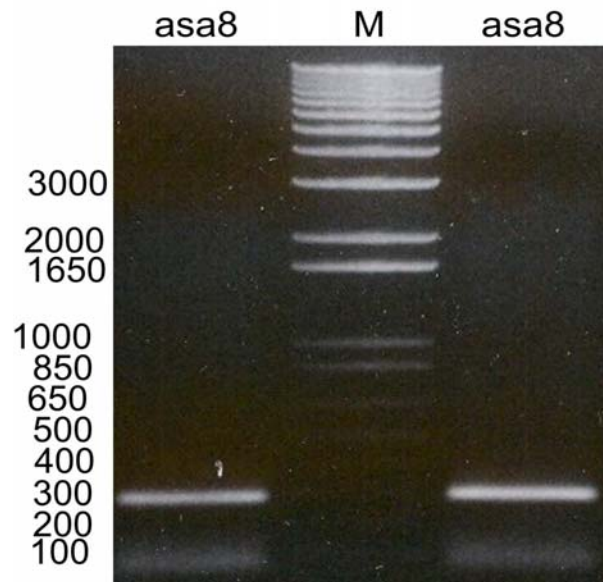
- 1) Se bloqueó la membrana con 10% de leche en TBS durante toda la noche, a temperatura ambiente
- 2) Se lavó la membrana 2 veces con TTBS durante 5 min

- 3) Se colocó el suero o primer anticuerpo a la dilución deseada en 1% de leche en TTBS
- 4) Se incubó a 4°C durante 3 h
- 5) Se lavó la membrana 2 veces con TTBS durante 5 min
- 6) Se colocó el anticuerpo secundario a dilución 1:3000 en 1% de leche en TTBS se incubó 2 h
- 7) Se lavó la membrana 2 veces con TTBS durante 5 min
- 8) Se agregó la solución de revelado y se dejó reaccionar hasta visualizar las bandas
- 9) Se detuvo la reacción enjuagando con agua

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Amplificación del gen *asa8* de *Polytomella sp* y clonación en el vector pGEM-T Easy

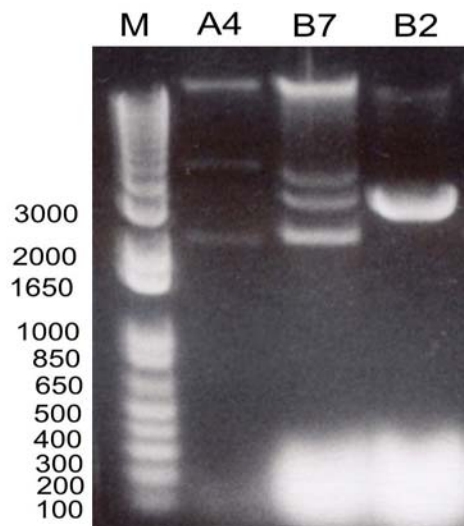
Se llevó a cabo la amplificación del cDNA del gen *asa8* a partir de la genoteca de cDNA de *Polytomella sp.*; el producto esperado era de 293 pb (Figura 18).



**Figura 18.** Amplificación del gen *asa8* a partir de la genoteca de cDNA de *Polytomella sp.* (M) Marcador, los tamaños se indican en pb.

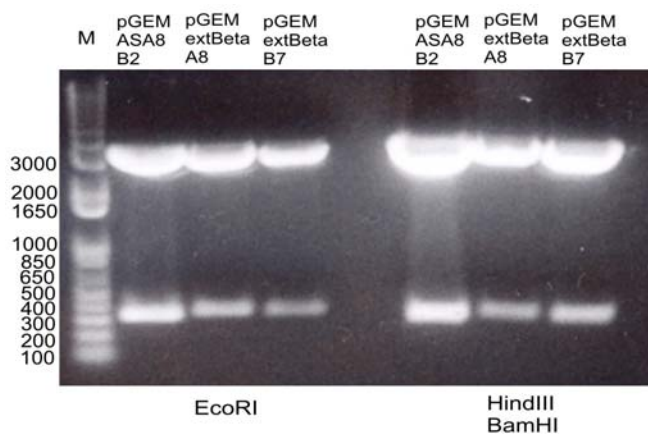
Una vez ligado en el vector pGEM se transformaron células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$  para guardar la construcción y replicar el vector. Se seleccionaron tres colonias tentativas que contuvieran el inserto (blancas) [A4, B7 y B2], se aisló el ADN con amortiguador TENS-acetato de sodio (Apéndice A) y se cortó con la enzima HindIII para linearizar (Figura 19).

Como el sitio HindIII no se encuentra en el vector pGEM sólo las clonas que contuvieran el inserto serían cortadas por la enzima ya que el sitio se encuentra en los oligonucleótidos diseñados. En la Figura 19 se observa que solamente la clona ASA8 B2 fue linealizada por HindIII por lo que se aisló



**Figura 19.** Reacción de restricción de tres clonas (A4), (B7), (B2) con HindIII. (M) Marcador, los tamaños se indican en pb.

el ADN por columna para realizar dos reacciones por separado, una con la enzima EcoRI (sitios del vector) para liberar el inserto y otra restricción secuencial con las enzimas BamHI y HindIII (presentes en los oligonucleótidos), esto para verificar los sitios de corte en los oligonucleótidos y poder visualizar el inserto correspondiente (Figura 20).



**Figura 20.** Restricción de una construcción de ASA8 y dos de la región C-terminal de la subunidad beta en pGEM con la enzima EcoRI (carriles 2-4) y secuencial con las enzimas HindIII y BamHI (carriles 5-7). (M) Marcador, los tamaños se indican en pb.

Se seleccionó la clona ASA8 B2 para purificar por columna midi de Qiagen y el producto se secuenció en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular con cebadores para los promotores SP6 y T7 (Apéndice C).

### 6.1.1. Alineamiento de la secuencia obtenida

La secuencia de nucleótidos obtenida se tradujo *in silico* con ayuda del servidor Expsy (<http://www.expasy.org/tools/dna.html>) y se alineó en el servidor ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) con la secuencia de la proteína reportada para ASA8 de *Polytomella* sp. encontrándose que la región de interés de ambas secuencias es igual (Figura 21).

SeqA	Name	Len (aa)	SeqB	Name	Len (aa)	Score
1	PsASA8	89	2	Recombinante	97	100

```

PsASA8          -----MVLGEVYLKDI LRTPPTGAIPANVPHPFQTSFYTYATKKLIPRHWYLLGGFTFTI 55
Recombinante    AGSAS MVLGEVYLKDI LRTPPTGAIPANVPHPFQTSFYTYATKKLIPRHWYLLGGFTFTI 60
                *****

PsASA8          TLYGILDGLRDSGKKKAYDEAIHAGKTPYTAGGH--- 89
Recombinante    TLYGILDGLRDSGKKKAYDEAIHAGKTPYTAGGH-SF 96
                *****

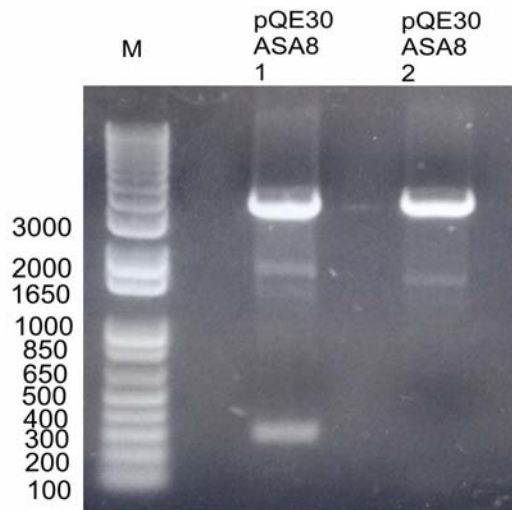
```

**Figura 21.** Alineamiento de la traducción de la secuencia obtenida a partir de la genoteca de cDNA de *Polytomella* sp con respecto a la proteína esperada.

### 6.2. Clonación del gen en el vector de expresión

A partir de la ligación en pQE30 y la transformación en *E. coli* DH5 $\alpha$  se seleccionaron dos clonas, se realizaron minipreps de Qiagen y se realizó una restricción secuencial, inicialmente con la enzima HindIII y posteriormente BamHI para visualizar el inserto (Figura 22)

Se seleccionó la clona 1 ya que presentó el inserto de aproximadamente 300 pb; se purificó por columna midi de Qiagen y el producto se secuenció con los oligonucleótidos diseñados para este fin.



**Figura 22.** Restricciones secuenciales de las construcciones pQE30-ASA8 1 y 2 con la enzima HindIII y posteriormente con la enzima BamHI. (M) Marcador; los tamaños se indican en pb.

### 6.2.1 Alineamiento de la secuencia obtenida

La secuencia obtenida se tradujo *in silico* en el servidor Expsy y se alineó con la secuencia reportada (Figura 23). Se encontró que ambas secuencias son iguales y que además la proteína a sintetizar contiene la etiqueta de 6 Histidinas (His-tag) en el extremo N-terminal, correspondientes al sistema de expresión utilizado. La masa calculada para la proteína recombinante fue de 11.3 kDa.

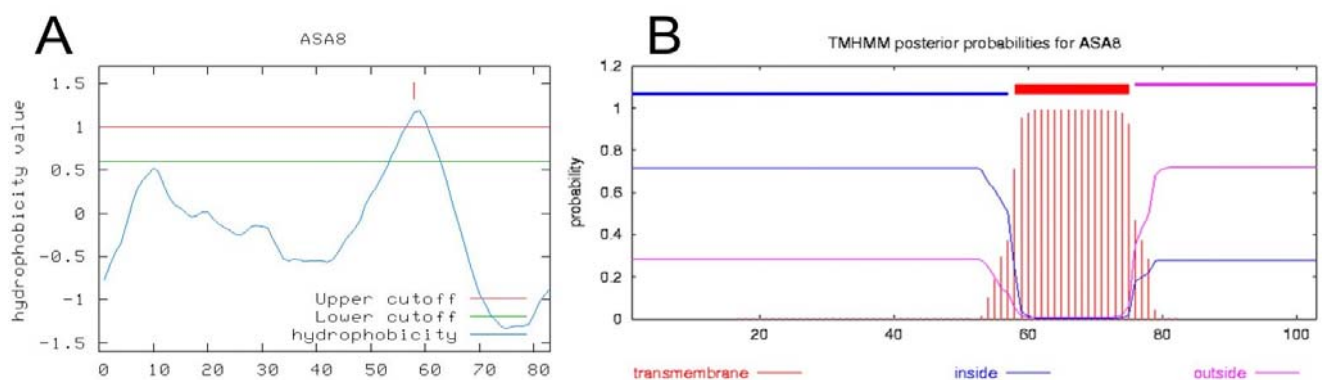
SeqA	Name	Len (aa)	SeqB	Name	Len (aa)	Score
1	PsASA8	89	2	Recombinante_His-Tag_	105	100

PsASA8	-----MVLGEVYLKDI	LRTPPTGAIPANVPHPFQTSFYTYA	36	
Recombinante_His-Tag_	MRGSHHHHHGSAS	MVLGEVYLKDI	LRTPPTGAIPANVPHPFQTSFYTYA	50
	*****			
PsASA8	TKKLIPRHWYLLGGFTFTITLYGILDGLRDSGKKKAYDEAIHAGKTPYTA		86	
Recombinante_His-Tag_	TKKLIPRHWYLLGGFTFTITLYGILDGLRDSGKKKAYDEAIHAGKTPYTA		100	
	*****			
PsASA8	GGH--		89	
Recombinante_His-Tag_	GGH-S		104	
	***			

**Figura 23.** Alineamiento de la traducción de la secuencia clonada en el vector pQE30 junto con la secuencia de la proteína esperada. Se observa que la secuencia clonada contiene la extensión de histidinas (his-tag).

La secuencia traducida *in silico* fue analizada mediante el programa Toppred disponible en el servidor Mobylye (<http://mobylye.pasteur.fr/cgi-bin/MobylyePortal/portal.py?form=toppred>) mediante un análisis de hidrofobicidad de la proteína recombinante con la escala Kyte y Doolittle; además también se realizó un análisis con el programa TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) a fin de conocer la naturaleza de la proteína. Ambos resultados sugieren la presencia de una región de alta hidrofobicidad, la cual muy probablemente es de un cruce transmembranal (Figura 24).



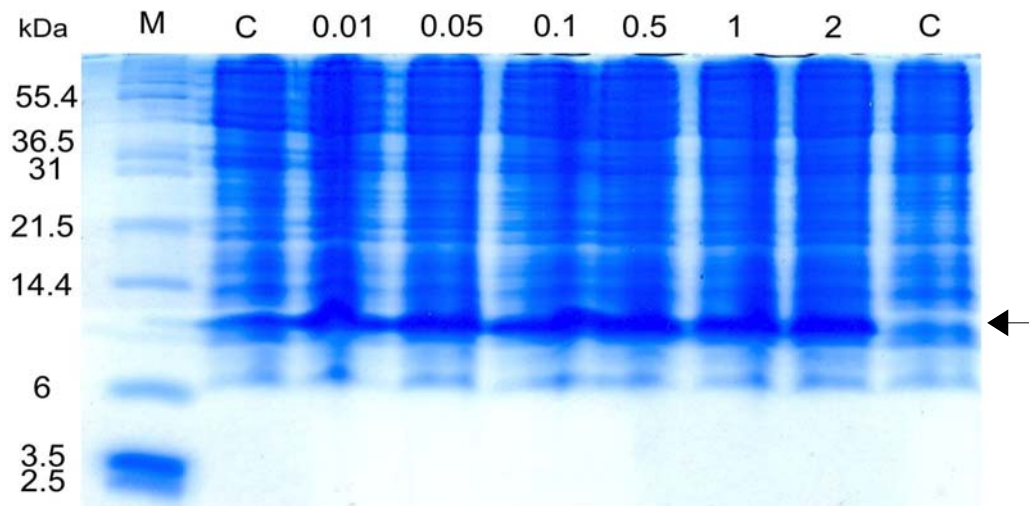
**Figura 24.** Análisis *in silico* de la hidrofobicidad de la proteína recombinante. (A) Análisis mediante el programa Toppred disponible en el servidor Mobylye (<http://mobylye.pasteur.fr/cgi-bin/MobylyePortal/portal.py?form=toppred>) utilizando la escala de Kyle-Doolittle. (B) Análisis mediante el programa TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>). Ambos análisis sugieren una región de alta hidrofobicidad presente entre los aminoácidos 50 al 70 aproximadamente.

### 6.3. Sobreexpresión de la proteína recombinante en *E. coli*

#### 6.3.1 Inducción con IPTG

En el análisis SDS-PAGE de los experimentos de inducción con IPTG en *E. coli* XL1-Blue, se observó la presencia de una banda de mayor intensidad en los carriles correspondientes a la cepa con la construcción, con respecto a los controles. Esta banda tiene una masa molecular de aproximadamente 11 kDa, lo cual corresponde a los 11.3 kDa calculados para la proteína recombinante (Figura 25).





**Figura 25.** Inducción de la expresión de la proteína ASA8 en *E. coli* XL1-Blue, (C) cepa sin construcción con 0.1 mM de IPTG, (carriles 3-8) distintas concentraciones crecientes de IPTG. (M) Marcador, los pesos se expresan en kDa. La flecha indica la región donde aparece la proteína recombinante correspondiente a 11 kDa.

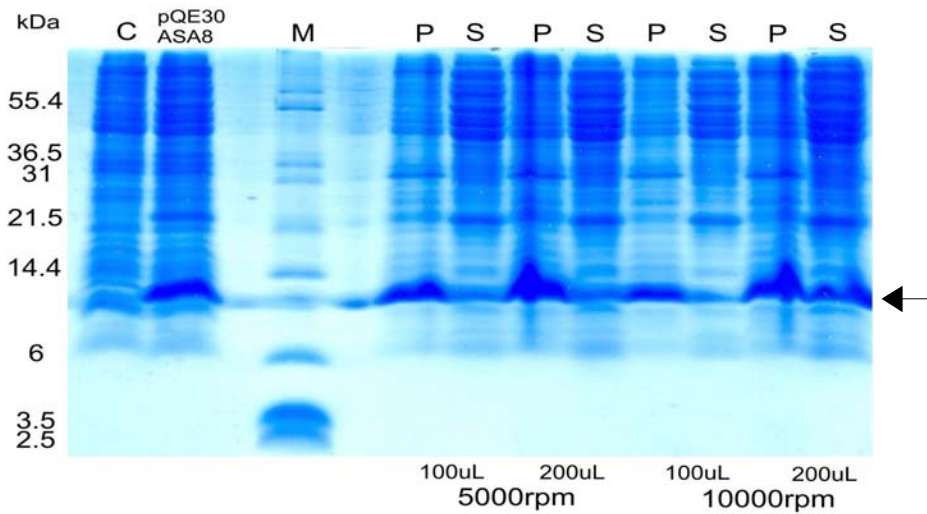
Se seleccionó la concentración de 0.1 mM de IPTG para los experimentos posteriores de sobreexpresión.

### 6.3.2. Análisis de fracciones

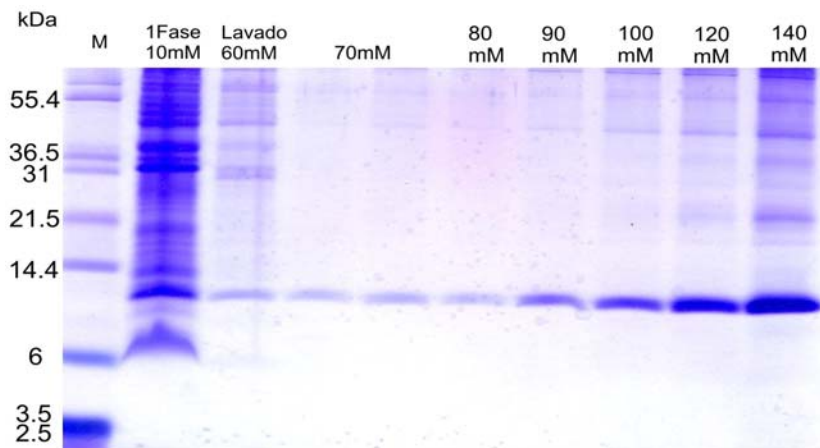
Como se observa en el análisis de las fracciones por SDS-PAGE (Figura 26), la localización de la proteína recombinante es en la fracción insoluble de la bacteria, muy probablemente en cuerpos de inclusión debido a la gran cantidad de proteína presente en la bacteria y al carácter hidrofóbico de la proteína.

### 6.4. Purificación de la proteína recombinante

En el análisis de SDS-PAGE de las fracciones de elución (Figura 27) se observó que existe una gran cantidad de proteína que no se une a la resina (carril 2) en presencia de 10 mM de imidazol. Sin embargo, también se observó una gran cantidad de proteína que presenta una unión inespecífica a la resina. Una fracción de ésta eluye en el lavado, mientras que otra fracción se observa en las diferentes concentraciones de elución. Por otro lado, la banda mayoritaria corresponde a la proteína de interés.



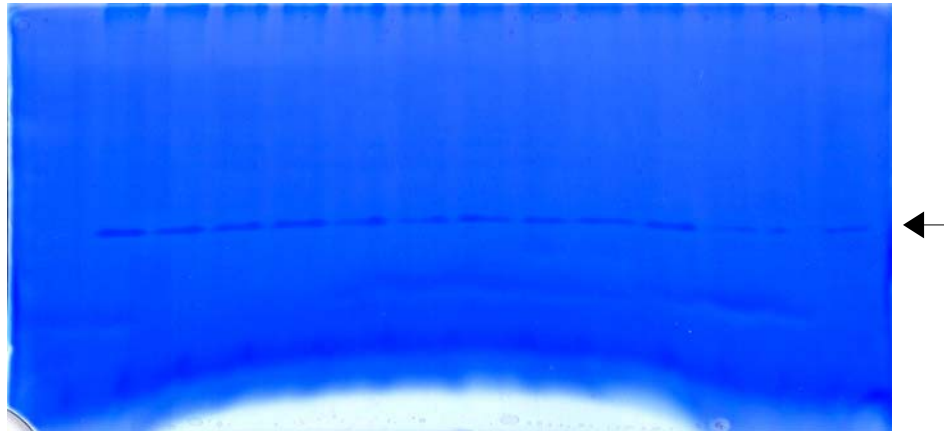
**Figura 26.** Sobreexpresión de la proteína recombinante en medio LB con 0.1 mM de IPTG y análisis de fracciones después de la sonicación. (C) cepa sin construcción con 0.1 mM de IPTG, (pQE30-ASA8) sobreexpresión con 0.1 mM de IPTG extracto crudo, (P) pastilla, (S) sobrenadante, (M) Marcador, los pesos se expresan en kDa. La flecha indica la región donde migra la proteína de interés.



**Figura 27.** Elución fraccionada a diferentes concentraciones de imidazol. Se indican las concentraciones utilizadas en mM, (M) Marcador, las masas moleculares se expresan en kDa.

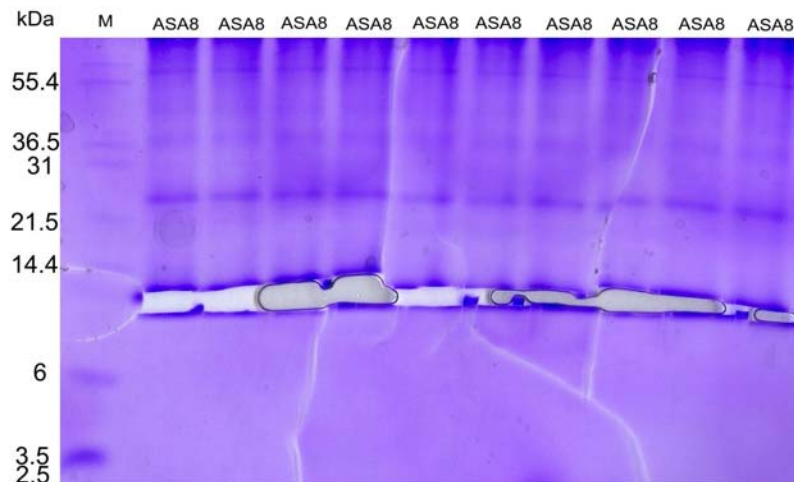
### 6.4.1. Purificación de la proteína para generar anticuerpos

Al observar el gel con azul de Coomassie en el amortiguador de cátodo sólo se presentó una banda teñida levemente (Figura 28); esto se debe a que en este tipo de geles se enmascara la presencia de bandas más tenues ya que todo el fondo presenta coloración azul. Sin embargo, permite la localización visual de la banda de interés y cortarla directamente sin necesidad de fijar y realizar una tinción adicional.



**Figura 28.** Gel SDS-PAGE con azul de Coomassie en el amortiguador de cátodo. Se visualiza la banda de interés correspondiente a la proteína recombinante (señalada con una flecha).

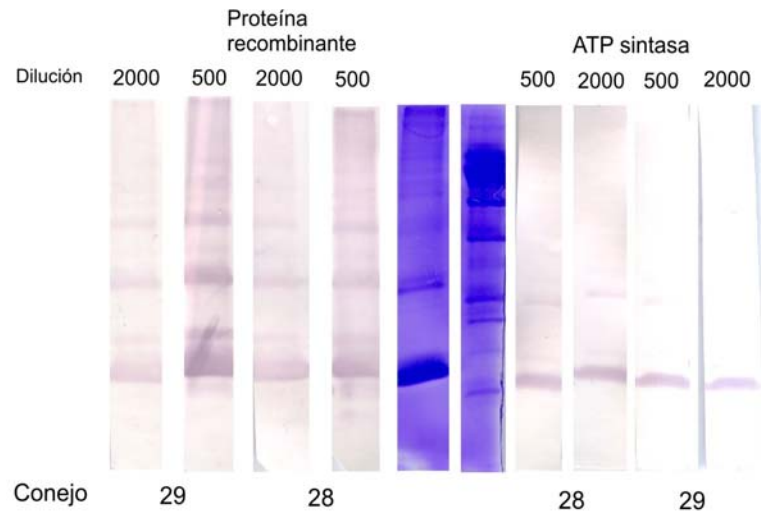
Al teñir el gel completamente con azul de Coomassie para verificar la presencia de otras proteínas, se observan las que presentan unión inespecífica a la resina; sin embargo, éstas son de mayor masa molecular, por lo que la banda cortada corresponde en su mayoría a la proteína recombinante (Figura 29).



**Figura 29.** Gel SDS-PAGE con azul de Coomassie en el amortiguador de cátodo. Se visualiza la banda cortada correspondiente a la proteína recombinante.

## 6.5. Producción de anticuerpos contra la proteína recombinante en conejo

El Western blot realizado a partir de la sangría de prueba reveló la presencia de anticuerpos contra la proteína recombinante así como contra la subunidad ASA8 de la F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP sintasa purificada de *Polytomella* sp. (Figura 30).



**Figura 30.** Western blot del suero producido en conejo contra la subunidad ASA8 de *Polytomella* sp; se utilizaron dos conejos (28 y 29). El suero se utilizó a diluciones de 500 y 2000. (Izquierda) proteína recombinante, (Centro) Gel SDS-PAGE con la proteína recombinante y la ATP sintasa purificada teñido con azul de Coomassie, (Derecha) ATP sintasa purificada de *Polytomella* sp. A diluciones relativamente altas, el suero obtenido reconoce específicamente a la subunidad ASA8 de la ATP sintasa mitocondrial del alga.

## 7. DISCUSIÓN

Con los avances modernos en la genómica, la proteómica y la bioinformática el número de proteínas que son producidas usando técnicas recombinantes se ha incrementado exponencialmente. Las técnicas de “High-Troughput Screening” han sido perfeccionadas para identificar proteínas con aplicaciones potenciales como agentes terapéuticos, en el diagnóstico o uso industrial (Arnau *et al*, 2006). Asimismo, existe una gran demanda de producción de proteínas recombinantes para estudios funcionales-estructurales, debido a la expansión de las bases de datos de secuencias genómicas (Tsumoto *et al*, 2003).

La ATP sintasa es una enzima ampliamente distribuida en la naturaleza. Existen subunidades conservadas en la estructura de los distintos organismos, como las que corresponden a la región catalítica del complejo, con 72% de identidad entre las subunidades de mayor peso molecular de las mitocondrias de bovino y la enzima de *E. coli* (Domínguez-Ramírez y Tuena de Gomez-Puyou, 2005). Sin embargo, desde las bacterias hasta los organismos eucariotas existe una gran variación entre las subunidades correspondientes al brazo periférico del estator. En este sentido las algas clorofíceas han adquirido una serie de péptidos novedosos (subunidades ASA) dejando a un lado las subunidades ortodoxas  $\epsilon$ , *b*, *d*, *e*, *f*, *g*, IF<sub>1</sub>, A6L y F6 (subunidades de mitocondria de bovino). Se ha propuesto que estas subunidades participan en la estructura del cuello periférico y en la dimerización de la enzima (Vázquez-Acevedo *et al.*, 2006; Cano-Estrada, 2007). Existe una gran cantidad de herramientas para llevar a cabo los estudios de la estructura-función de estas subunidades dentro del complejo V mitocondrial, una de éstas es la producción de proteínas recombinantes ya que permite obtener una cantidad considerable de la proteína deseada.

Dentro de los sistemas para la producción heteróloga de genes encontramos una gran diversidad de organismos, entre ellos las bacterias *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *B. megaterium*, *B. brevis*, la levadura *Saccharomyces cerevesiae* y las células de mamífero, así como otros que incluyen hongos

filamentosos, células de insectos, oocitos de rana, plantas y animales transgénicos y sistemas *in vitro* (Fothergill-Gilmore, 1993; Terpe, 2006). Sin embargo, la bacteria Gram negativa *E. coli* permanece como el sistema más atractivo debido a su facilidad para crecer rápidamente a densidades altas en distintos sustratos, su genética bien caracterizada y la disposición de diversos sistemas de vectores de clonación y cepas mutantes (Baneyx, 1999). Para la expresión rutinaria de proteínas, las cepas de *E. coli* BL21, K12 y sus derivados, son las más frecuentemente usadas (Terpe, 2006). Aproximadamente el 80% de las proteínas utilizadas para resolver las estructuras 3D indexadas en el Protein Data Bank en 2003, fueron preparadas en sistemas de expresión en *E. coli* (Sørensen y Mortensen, 2005).

Las cepas utilizadas para la expresión deben ser deficientes en las proteasas naturales más poderosas, así como mantener la estabilidad de la expresión del plásmido teniendo los elementos genéticos necesarios para cada sistema de expresión, por ejemplo codones especiales (Sørensen, 2005). La cepa utilizada para la sobreexpresión (XL1-Blue) no es especializada en este tipo de proceso, ya que no tiene alguna deficiencia en proteasas; sin embargo, está diseñada para el manejo de construcciones plasmídicas pues es deficiente en DNAsas y recombinasas. Una desventaja de la producción de proteínas recombinantes de uso terapéutico en *E. coli* es la acumulación de lipopolisacárido (LPS) conocido como endotoxina que tiene un efecto pirogénico en humanos y otros mamíferos (Terpe, 2006).

La ingeniería genética y la tecnología del DNA recombinante son términos utilizados para referirse a la colección de procedimientos para la manipulación experimental del material genético. En el centro de estas técnicas se encuentra el proceso de clonación de genes. El componente central de la clonación de genes es el vector o vehículo, el cual transporta el gen en la célula de interés y es el encargado de su replicación (Fothergill-Gilmore, 1993). El sistema pGEM (Figura 15) está diseñado para la ligación de productos de PCR mediante sus extremos de timina; además, es un vector multicopias lo que resulta muy favorable ya que es posible obtener cantidades grandes de plásmido puro, que permiten llevar a cabo tareas como la secuenciación, el corte y ligación de fragmentos para realizar las construcciones necesarias.

Por muchos años, el operón de utilización de la lactosa de *E. coli* (operón *lac*) ha sido uno de los paradigmas de la regulación de la expresión genética en procariotes; por lo que varios de los promotores usados para el manejo de la expresión de genes heterólogos se han construido a partir de éste (Baneyx, 1999). El sistema pQE30 contiene el operador del operón *lac* lo que permite una inducción mediante el isopropil-beta-D-tiogalactopiranosido (IPTG) el cual es el inductor más comúnmente utilizado (Hanning y Makrides, 1998). Existe una gran diversidad de cuestiones no deseadas durante la sobreexpresión como: muerte celular, formación de cuerpos de inclusión, producción de proteína sin actividad, producción de proteína truncada o no producción de la misma. Estas cuestiones tienen distintas causas, como pueden ser una gran expresión, un mal plegamiento o una incompatibilidad de codones (Terpe, 2006). Asimismo, la expresión genética está controlada, entre otros factores, por el decaimiento del ARNm. La vida media del ARNm en *E. coli*, a 37°C, varía desde unos segundos hasta un máximo de 20 min y la cantidad expresada depende directamente de la estabilidad del ARNm (Rauhut y Klug 1999, Regnier y Arraino, 2000). En el caso de la proteína ASA8, como puede observarse en los resultados (Figura 25), la expresión de la proteína recombinante fue muy favorable, independiente de la concentración de IPTG utilizada, ya que la sobreexpresión se lleva a cabo desde una concentración de 0.01 mM hasta 2 mM; esto puede deberse a la estabilidad del ARNm, o a que el sistema de codones utilizados en la proteína es muy semejante al sistema de codones que maneja la cepa X11-Blue; es decir, que los codones utilizados en la proteína son comunes ya que la cepa en cuestión no contiene codones especiales porque no está diseñada para la expresión heteróloga. Por otro lado, la sobreexpresión no conlleva a la muerte celular ya que ésta se llevó a cabo durante 24 h obteniendo resultados muy similares a los mostrados en la Figura 25. Lo anterior puede deberse a la naturaleza hidrofóbica de la proteína (Figura 24), pues al no ser una proteína soluble tiende a aglomerarse junto con otras proteínas recombinantes en grandes cantidades, formando los cuerpos de inclusión. La formación de estos cuerpos ofrece algunas ventajas en la producción de proteínas recombinantes, ya que estas proteínas pueden ser tóxicas en su conformación nativa o podrían ser inestables en el citoplasma de *E. coli* debido a la proteólisis (Misawa y Kumagai, 1999).

Wilkinson y Harrison propusieron un modelo para el cálculo teórico de los porcentajes de solubilidad de las proteínas recombinantes expresadas en *E. coli*; los resultados mostrados en la Figura 26 señalan que la proteína recombinante tiende a aglomerarse en la fracción insoluble de la bacteria lo que concuerda con el 81.7% de proteína insoluble predicho en el servidor <http://www.biotech.ou.edu> (Wilkinson y Harrison, 1991).

Existen diversos ejemplos de proteínas recombinantes de uso terapéutico que han sido expresadas en bacterias y obtenidas de manera directa (soluble): hormona de crecimiento, interferón gamma, interleucina 2 (IL-2), prouroquinasa, activador del plasminógeno tisular. Por el contrario, también se han obtenido proteínas a partir de cuerpos de inclusión, por ejemplo: proinsulina, calcitonina, factor de crecimiento I parecido a insulina (IGF-I) (Misawa y Kumagai, 1999). Si bien las proteínas recombinantes son producidas con diversos fines, uno de ellos es la identificación de sus funciones biológicas y, por lo tanto, deben ser producidas en su conformación nativa ya que de no ser así no pueden ser buenos candidatos para su evaluación en ensayos biológicos (Tsumoto *et al*, 2003). Esta conformación puede ser alcanzada naturalmente en la traducción de la proteína en la bacteria o en su defecto a partir de la proteína purificada de los cuerpos de inclusión.

Las estrategias para disminuir la acumulación de proteínas en cuerpos de inclusión pueden ser diversas; por ejemplo, disminuir la temperatura de expresión, sustitución de aminoácidos, coexpresión de chaperonas, utilizar una proteína de fusión hidrofílica, adicionar sorbitol, sacarosa o rafinosa al medio, cambiar las condiciones del cultivo, como pH o cambiar la cepa utilizada (Hockney, 1994; Makrides, 1996). En el presente trabajo se buscó obtener la mayor cantidad de proteína recombinante a fin de tener un buen inóculo para producir una óptima respuesta inmune en conejo, por lo que se decidió trabajar la proteína a partir de los cuerpos de inclusión.

La inclusión de una etiqueta de afinidad es una herramienta importante cuando se busca la purificación de la proteína obtenida. Las etiquetas de afinidad comúnmente utilizadas son la de polihistidinas (His-



tag) y la de glutathion S-transferasa (GST) (Terpe, 2003). Para estudios estructurales, más del 60% de las proteínas producidas incluye una cola de polihistidinas (Arnau, 2006); adicionalmente, la inclusión de una His-tag permite llevar a cabo la purificación de la proteína deseada mediante sistemas IMAC (Immobilized Metal-ion affinity chromatography). La purificación a partir de colas de histidina se basa en la quelación de cationes metálicos; el catión metálico es complejado e inmovilizado en una matriz, esto produce la unión de la cadena imidazólica de la histidina ya que ésta muestra una alta afinidad por el catión (Arnau *et al*, 2006). Sin embargo, este sistema no es recomendado para proteínas que contengan iones de metales u otros aminoácidos como cisteína o proteínas con regiones ricas en histidinas del organismo utilizado, ya que puede resultar en unión inespecífica e indeseada durante la purificación (Arnau *et al*, 2006). Como puede observarse en la Figura 27, aunque en la primera fase de la purificación se logró eliminar gran cantidad de la proteína que podría presentar una unión inespecífica, adicionando 10 mM de imidazol al momento de agregar la resina, y eliminar otra parte en los lavados de 60 mM, existe una considerable cantidad de proteína que aún continúa unida a la resina y que eluye junto con la proteína de interés; esto puede deberse a que a pesar de ser la fracción insoluble de la bacteria sonicada continúa representando una gran poza de proteínas de diversa naturaleza por lo que no es extraño que existan secuencias que presenten afinidad por el Ni<sup>2+</sup> presente en la resina. Los cuerpos de inclusión solubilizados contienen impurezas, las cuales se asocian con las proteínas expresadas e interfieren con el plegamiento, por lo que debe llevarse a cabo una purificación previa para minimizar dichas interferencias (Tsumoto *et al*, 2003). Una estrategia para purificar cuerpos de inclusión a partir de sus impurezas asociadas es que éstos pueden ser lavados con detergentes como Triton X-100 y desoxicolato (Misawa y Kumagai, 1999). Generalmente, el rendimiento y la eficiencia de un procedimiento específico de purificación depende de los niveles de optimización del método para la proteína individual (Arnau *et al*, 2006).

Los anticuerpos producidos en conejo contra la proteína recombinante presentan una alta especificidad por la subunidad ASA8 de la enzima purificada a partir de *Polytomella sp* como se observa en la Figura 30; a pesar de que se alcanza a visualizar una banda en la región superior derecha de la Figura 30 esto

puede deberse a una unión inespecífica de los anticuerpos ya que se trabajó con el suero entero del conejo a diluciones muy bajas. Además, hay que mencionar que los anticuerpos producidos son convencionales, es decir, contienen una mezcla de diversas inmunoglobulinas capaces de reconocer secuencias (si bien específicas) cortas de aminoácidos (Abbas *et al*, 2007). Lo anterior puede corroborarse en la región izquierda de la Figura 30, en donde el suero obtenido fue confrontado contra la fracción eluída en la sección “Purificación de la proteína para generar anticuerpos”, puede observarse que existe unión de los anticuerpos a algunas bandas de mayor peso molecular; al ser un “pool” de proteínas es posible que algunas de sus secuencias sean reconocida por las inmunoglobulinas; además, al ser un gel desnaturizante, las proteínas se encuentran de manera “linealizada” por lo que diversas regiones, que normalmente estarían restringidas debido a la conformación de la proteína, se encuentran expuestas y la unión de las inmunoglobulinas es altamente facilitada.

Como ya se mencionó, lo óptimo para llevar a cabo estudios de estructura-función es obtener la proteína de interés en su conformación nativa; esto no pudo lograrse en este trabajo ya que la sobreexpresión de la proteína recombinante condujo a la aglomeración dentro de cuerpos de inclusión; una opción sería purificar la proteína a partir de éstos y plegarla. Sin embargo, la optimización de un procedimiento de plegamiento *in vitro* de proteínas a partir de los cuerpos de inclusión solubilizados es un proceso que consume mucho tiempo y no siempre conduce a altos rendimientos (Sørensen y Mortensen, 2005). Existen dos grandes etapas en la recuperación de proteínas nativas a partir de cuerpos de inclusión; éstas son: la solubilización y el plegamiento. El plegamiento de las proteínas comienza una vez solubilizados los cuerpos de inclusión, disminuyendo la cantidad del agente desnaturizante utilizado. Ésta no es una reacción de un solo paso, ya que debe competir con otras reacciones como la de mal plegamiento y la agregación. Para realizar la optimización de la obtención de la proteína en su conformación nativa pueden llevarse a cabo diversos procedimientos; sin embargo, ninguno es absoluto y cada optimización debe efectuarse a cabo para cada proteína en particular. Algunos de los procedimientos son: diálisis directa de un solo paso, diálisis directa en varios pasos,

diálisis continua, filtración por gel con intercambio de amortiguador, dilución directa (adicionar el amortiguador de solubilizado al amortiguador de plegamiento), dilución reversa (adicionar el amortiguador de plegamiento al amortiguador de solubilizados), mezclado de ambos amortiguadores, dilución pausada, plegamiento en fase sólida y asistencia de cosolutos (Tsumoto *et al*, 2003).

En resumen, el presente trabajo permitió establecer las condiciones para una amplificación del gen *asa8* a partir de la genoteca de cDNA de *Polytomella* sp. Asimismo, también se establecieron las condiciones para la sobreexpresión de la proteína recombinante en grandes cantidades en la cepa *E. coli* XL1-Blue; esta sobreexpresión permitirá realizar ensayos de plegamiento *in vitro* de la proteína a fin de llevar a cabo estudios de interacción de la proteína en la ATP sintasa de *Polytomella* sp. Por último, también se generaron anticuerpos específicos contra la subunidad ASA8 de la ATP sintasa de *Polytomella* sp.

Gracias al sistema de sobreexpresión utilizado en este trabajo, ésta es la primera ocasión en que es posible obtener anticuerpos específicos dirigidos contra una de las subunidades hidrofóbicas (transmembranales) del complejo de la F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP sintasa mitocondrial de algas clorofíceas.

## 8. RESUMEN DE RESULTADOS

- Se clonó correctamente el cDNA del gen *asa8* de *Polytomella sp* en vectores de clonación.
- Se sobreexpresó la proteína recombinante ASA8 en *E. coli* XL1-Blue.
- Se generaron anticuerpos específicos contra la subunidad ASA8 de la ATP sintasa mitocondrial de *Polytomella sp.*, que reconocieron específicamente a dicho polipéptido.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

- Abbas A. K., Lichtman A. H., Pillai S. (2007) Cellular and molecular immunology. 6<sup>th</sup> edition Ed. Saunders Elsevier, China. pp. 75-96, 113-136.
- Alfonzo M., Kandrach M. A., Racker E. (1981) Isolation, Characterization, and Reconstitution of a Solubilized Fraction Containing the Hydrophobic Sector of the Mitochondrial Proton Pump. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* **13**: 375-391.
- Arnau J., Lauritzen C., Petersen G. E., Pedersen J. (2006) Current strategies for the use of affinity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins. *Protein Expression and Purification* **48**: 1–13.
- Baneyx F. (1999) Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology* **10**: 411-421.
- Boyer P. D. (1997) The ATP synthase – A splendid molecular machine. *Annual Review of Biochemistry* **66**: 717-49.
- Brunner S., Everard-Gigot V., Stuart R. A. (2002) Structure of the Yeast F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP Synthase Forms Homodimers. *The Journal of Biological Chemistry* **277**: 48484–48489.
- Cano-Estrada A. (2007) Estudio de la topología de las subunidades ASA1 a 9 de la ATP sintasa mitocondrial del alga incolora *Polytomella sp.* Tesis de Maestría en Ciencias, Instituto de Fisiología Celular, UNAM, México.
- Cárabez-Trejo A., Sandoval Z. F. (2002) Ultraestructura mitocondrial. Capítulo 2. En: Vázquez-Memije M. E., Tuena de Gómez Puyou M. Mitocondria, una mirada a la evolución de los conceptos básicos y modernos. Editorial Prado, México. pp. 21-48.
- Cardol P., González-Halphen D., Reyes-Prieto A., Baurain D., Matagne R. F., Remacle C. (2005) The Mitochondrial Oxidative Phosphorylation Proteome of *Chlamydomonas reinhardtii* Deduced from the Genome Sequencing Project. *Plant Physiology* **137**: 447-459.
- Cubas P. (2008) Chlorophyta (algas verdes), [http://www.aulados.net/Botanica/Curso\\_Botanica/Algas\\_verdes/](http://www.aulados.net/Botanica/Curso_Botanica/Algas_verdes/)

- Chávez E., Zazueta C. (2002) Transporte de metabolitos en mitocondrias. Capítulo 3. En: Vázquez-Memije M. E., Tuena de Gómez Puyou M. Mitocondria, una mirada a la evolución de los conceptos básicos y modernos. Editorial Prado, México. pp. 49-64.
- Domínguez-Ramírez L., Tuena de Gómez-Puyou M. (2005) La  $F_1F_0$  ATP sintasa: un complejo proteico con gran versatilidad estructural y funcional. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas* **8**:18-27.
- Dudkina N. V., Heinemeyer J., Keegstra W., Boekema E. J., Braun H. P. (2005) Structure of dimeric ATP synthase from mitochondria: An angular association of monomers induces the strong curvature of the inner membrane. *Federation of European Biochemical Societies Letters* **579**: 5769-5772.
- Dudkina N. V., Sunderhaus S., Braun H. P., Bockema E. J. (2006) Characterization of dimeric ATP synthase and cristae membrane ultrastructure from *Saccharomyces* and *Polytomella* mitochondria. *Federation of European Biochemical Societies Letters* **580**: 3427-3432.
- Fothergill-Gilmore L. (1993) Recombinant Protein Technology. Capítulo 13. En: Franks F. Protein Biotechnology. Isolation, Characterization, and Stabilization. Humana Press. USA. pp. 467-487.
- Franzén L. G., Falk G. (1992) Nucleotide sequence of cDNA clones encoding the beta subunit of mitochondrial ATP synthase from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: the precursor protein encoded by the cDNA contains both an N-terminal presequence and a C-terminal extension. *Plant Molecular Biology* **19**: 771-80.
- Fronzes R., Wiemann T., Vaillier J., Velours J., Brèthes D. (2006) The Peripheral Stalk Participates in the Yeast ATP Synthase Dimerization Independently of e and g Subunits. *Biochemistry* **45**: 6715-6723.
- Funes S., Davidson E., Claros M. G., van Lis R., Pérez-Martínez X., Vázquez-Acevedo M., King M. P., González-Halphen D. (2002) The Typically Mitochondrial DNA-encoded ATP6 Subunit of the  $F_1F_0$ -ATPase Is Encoded by a Nuclear Gene in *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Journal of Biological Chemistry* **277**: 6051-6058.
- Gledhil J. R., Walker J. E. (2005) Inhibition sites in  $F_1$ -ATPase from bovine heart mitochondria. *Biochemical Journal* **386**:591-598.
- Golden T. R., Pedersen P. L. (1998) The Oligomycin Sensitivity Conferring Protein of Rat Liver Mitochondrial ATP Synthase: Arginine 94 Is Important for the Binding of OSCP to  $F_1$ . *Biochemistry* **37**: 13871-13881.

- Gómez-Lojero C., Gutiérrez-Cirlos M. E. B., (2002) La mitocondria: un ensayo histórico de un organelo transductor de energía. Capítulo 1 En: Vázquez-Memije M. E., Tuena de Gómez Puyou M. Mitocondria, una mirada a la evolución de los conceptos básicos y modernos. Editorial Prado, México. pp. 1-20.
- González-Halphen D., Pérez-Martínez X., Funes S., Reyes-Prieto A., Santillán-Torres J. L. (2003) La migración de genes de la mitocondria al núcleo y la evolución de los genomas mitocondriales. Mensaje Bioquímico Vol. XXVII, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- González-Halphen D., Vázquez-Acevedo M. (2002) La cadena respiratoria mitocondrial: un enfoque estructural. Capítulo 4. En: Vázquez-Memije M. E., Tuena de Gómez Puyou M. Mitocondria, una mirada a la evolución de los conceptos básicos y modernos. Editorial Prado, México pp. 65-88.
- Hanning G., Makrides S. C. (1998) Strategies for optimizing heterologous protein expression in *Escherichia coli*. *Trends in Biotechnology* **16**: 54-60.
- Hockney R. C. (1994) Recent developments in heterologous protein production in *Escherichia coli*. *Trends in Biotechnology* **12**: 456-463 .
- Itoh H., Takahashi A., Adachi K., Noji H., Yasuda R., Yoshida M., Kinoshita K. (2004) Mechanically driven ATP synthesis by F<sub>1</sub>-ATPase. *Nature* **427**:465-8.
- Ko Y. H., Hüllihen J., Hong S., Pedersen P. L. (2000) Mitochondrial F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP Synthase. *The Journal of Biological Chemistry* **275**: 32931-32939.
- Koolman J., Röhm K. H. (2004) Bioquímica *Texto y Atlas*. 3ª Edición. Editorial Médica-Panamericana, Alemania. pp. 121-151, 210-215.
- Makrides S. C. (1996) Strategies for achieving high level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiological Reviews* **60**: 512-538.
- Margulis L. (1970) Recombination of Non-chromosomal Genes in *Chlamydomonas*: Assortment of Mitochondria and Chloroplast?. *Journal of Theoretical Biology* **26**: 337-342.
- Minauro-Sanmiguel F., Wilkens S., García J. J. (2005) Structure of dimeric mitochondrial ATP synthase: Novel F<sub>0</sub> bridging features and the structural basis of mitochondrial cristae biogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **102**: 12356-12358.

- Misawa S., Kumagai I. (1999) Refolding of Therapeutic Proteins Produced in *Escherichia coli* as Inclusion Bodies. *Biopolymers (Peptide Science)* **51**: 297–307.
- Nelson D. L., Cox M. M. (2005) Lehninger Principios de Bioquímica, 4<sup>a</sup> edición, Ediciones Omega, pp. 690-750.
- Nurani G., Franzén L. G. (1996) Isolation and characterization of the mitochondrial ATP synthase from *Chlamydomonas reinhardtii*. cDNA sequence and deduced protein sequence of the alpha subunit. *Plant Molecular Biology* **31**: 1105-16.
- Pedersen P. L. (2005) Transport ATPases: Structure, Motors, Mechanism and Medicine: A Brief Overview. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* **37**: 349-357.
- Rauhut R., Klug G. (1999) mRNA degradation in bacteria. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews* **23**: 353-370.
- Regnier P., Arraiano C. A. (2000) Degradation of mRNA in bacteria: emergence of ubiquitous features. *BioEssays* **22**: 235-244.
- Schägger H. (1994) Native Gel Electrophoresis. Capítulo 4. En: von Jagow G. & Schägger H. (eds.) A Practical Guide to Membrane Protein Purification. Academic Press. pp 81-103.
- Schägger H. (2002) Respiratory chain supercomplexes of mitochondria and bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta* **1555**: 154-159.
- Scheffler I. E. (1999) Mitochondria. Ed. Wiley-Liss, USA pp. 7-14, 246-272.
- Smith D. R., Lee R. W. (2008) Mitochondrial Genome of the Colorless Green Alga *Polytomella capuana*: A Linear Molecule with an Unprecedented GC Content. *Molecular Biology and Evolution* **25**: 487-496.
- Sørensen H. P., Mortensen K. K. (2005) Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology* **115**: 113–128.
- Stevens B. W., Lilien R. H., Georgiev I., Donald B. R., Anderson A. C. (2006) Redesigning the PheA Domain of Gramicidin Synthetase Leads to a New Understanding of the Enzyme's Mechanism and Selectivity. *Biochemistry* **45**: 15495-15504.



- Stock D., Gibbons C., Arechaga I., Leslie GW A., Walker J. E. (2000) The rotary mechanism of ATP synthase. *Current Opinion in Structural Biology* **10**: 672-679.
- Terpe K. (2003) Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied Microbiology and Biotechnology* **60**: 523–533.
- Terpe K. (2006) Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied Microbiology and Biotechnology* **72**: 211–222.
- Tsumoto K., Ejima D., Kumagai I., Arakawac T. (2003) Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies. *Protein Expression and Purification* **28**: 1–8.
- van Lis R., Atteia A., Mendoza-Hernández G., González-Halphen D. (2003) Identification of Novel Mitochondrial Protein Components of *Chlamydomonas reinhardtii* A Proteomic Approach. *Plant Physiology* **132**: 318-330.
- van Lis R., González-Halphen D., Atteia A. (2005) Divergence of the mitochondrial electron transport chains from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* and its colorless close relative *Polytomella* sp. *Biochimica et Biophysica Acta* **1708**: 23-34.
- van Lis R., Mendoza-Hernández G., Groth G., Atteia A. (2007) New Insights into the Unique Structure of the F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP Synthase from the Chlamydomonad Algae *Polytomella* sp. and *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology* **144**: 1190-1199.
- Vázquez-Acevedo M., Cardol P., Cano-Estrada A., Lapaille M., Remacle C., González-Halphen D. (2006) The mitochondrial ATP synthase of chlorophycean algae contains eight subunits of unknown origin involved in the formation of an atypical stator-stalk and in the dimerization of the complex. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* **38**: 271-82.
- Walker J. E., Dickson V. K. (2006) The peripheral stalk of the mitochondrial ATP synthase. *Biochimica et Biophysica Acta* **1757**: 286-296.
- Weber J. (2006) ATP synthase: Subunit-subunit interactions in the stator stalk. *Biochimica et Biophysica Acta* **1757**: 1162-1170.
- Wilkinson, D. L., Harrison, R. G., (1991) Predicting the solubility of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Biotechnology (N. Y.)* **9**: 443–448.

Yoshida M., Muneyuki E., Hisabori T., (2001) ATP Synthase – A marvellous rotary engine of the cell.  
*Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2: 669-677.

**Direcciones electrónicas:**

<http://128.128.175.211/fedora/get/data:288628/LocalImage>

[http://bp1.blogger.com/\\_DZH2cmCoois/Rw-OYR\\_zsKI/AAAAAAAAADaM/LtXdx\\_Wo3W4/s1600-h/chlamydomonas.jpg](http://bp1.blogger.com/_DZH2cmCoois/Rw-OYR_zsKI/AAAAAAAAADaM/LtXdx_Wo3W4/s1600-h/chlamydomonas.jpg)

<http://fig.cox.miami.edu/~cmallery/150/cells/c28x4euk-origin.jpg>

<http://mobylye.pasteur.fr/cgi-bin/MobylyePortal/portal.py?form=toppred>

<http://robeta.bakerlab.org/>

<http://www.biotech.ou.edu>

<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>

<http://www.chlamy.org/>

<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>

<http://www.expasy.org/tools/dna.html>

<http://www.genome.jp/kegg/pathway/map/map00190.html>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bookres.fcgi/mcb/ch16f30.gif>

<http://www.promega.com/tbs/tm042/tm042.pdf>

<http://www.qiagen.com/literature/pqesequences/pqe3x.pdf>

## APÉNDICE A

### Metodologías generales de biología molecular

#### Miniprep (Amortiguador TENS-Acetato de sodio)

Se basa en una lisis alcalina, neutralización y la posterior separación de restos celulares y ADN cromosomal por centrifugación. Finalmente el ADN es precipitado con etanol, lavado y resuspendido en agua. El protocolo es:

- 1) Sembrar masivamente en un cuarto de caja Petri con LB + antibiótico
- 2) Tomar con un palillo estéril parte del cultivo
- 3) Depositar en 50  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O estéril
- 4) Resuspender con vórtex
- 5) Adicionar 300  $\mu$ L de amortiguador TENS y agitar con vórtex
- 6) Dejar la lisis 5 min a temperatura ambiente
- 7) Adicionar 150  $\mu$ L de acetato de sodio 3M pH=5.2 y agitar con vórtex
- 8) Centrifugar 2 min a 14000 rpm
- 9) Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo
- 10) Adicionar 900  $\mu$ L de EtOH al 100% preincubado a -20°C
- 11) Centrifugar 2 min a 14000 rpm
- 12) Descartar el sobrenadante
- 13) Lavar el botón con 1 mL de EtOH al 70% preincubado a -20°C
- 14) Centrifugar 2 min a 14000 rpm
- 15) Descartar el sobrenadante y dejar secar al aire
- 16) Resuspender en 30  $\mu$ L de agua

#### Transformación

Este método se basa en la incorporación de ADN exógeno en una cepa receptora debido a un choque térmico a 42°C. El protocolo es:

- 1) Descongelar el vector en hielo
- 2) Descongelar células competentes en hielo
- 3) Colocar 50  $\mu$ L de células competentes en un tubo estéril
- 4) Agregar 1  $\mu$ L del vector purificado (todo [aproximadamente 20  $\mu$ L] en caso de ser una reacción de ligación)
- 5) Incubar 30 min en hielo
- 6) Incubar 2 min a 42 °C
- 7) Incubar 2 min en hielo

- 8) Adicionar 200  $\mu$ L de medio LB líquido
- 9) Incubar 1 h a 37°C
- 10) Sembrar en una caja Petri con medio LB + Antibiótico de selección
- 11) Incubar de 18 -24 h a 37°C

### **Preparación de células ultracompetentes (todo el procedimiento en campana)**

- 1) Hacer un cultivo de 4 mL “over-night” de la cepa a utilizar
- 2) Tomar una alícuota de 150  $\mu$ L del cultivo “over-night” e inocular 20 mL de medio LB
- 3) Agregar 200  $\mu$ L de una solución 1M MgCl<sub>2</sub> y 1M MgSO<sub>4</sub>
- 4) Incubar a 20 °C, 200 rpm hasta un densidad óptica de 0.5 a  $\lambda = 600$  nm
- 5) Bajar las células a 3500 rpm, 10 min, a 4°C
- 6) Descartar el sobrenadante
- 7) Resuspender en 5 mL de amortiguador TB estéril
- 8) Incubar en hielo 10 min
- 9) Repetir pasos 5-8
- 10) Bajar las células a 3500 rpm 10 min a 4°C
- 11) Descartar el sobrenadante
- 12) Resuspender en 2 mL de TB estéril
- 13) Adicionar 140  $\mu$ L de dimetilsulfóxido
- 14) Alicuotar (200  $\mu$ L) en tubos Eppendorf
- 15) Sumergir 1 min en nitrógeno líquido
- 16) Guardar a -70°C

### **Geles de agarosa (1%)**

- 1) Disolver con calentamiento 1 g de agarosa en 100 mL de amortiguador TAE 1X
- 2) Dejar enfriar a 60 °C
- 3) Agregar 1  $\mu$ L de solución de bromuro de etidio
- 4) Colocar el peine y dejar solidificar

### **Corte con endonucleasas de restricción**

Las endonucleasas de restricción son enzimas que cortan el ADN en sitios específicos, estas regiones se reconocen como secuencias palindrómicas dentro de ambas hebras del ADN. Los cortes realizados con cada enzima se hicieron utilizando los reactivos indicados para cada una de ellas, utilizando el amortiguador incluido y las condiciones de 37°C durante 1:30 h. En el caso de restricciones secuenciales primero se realizó la restricción con una enzima, se purificó con Qiagen QIAquick PCR Purification Kit y posteriormente se realizó la segunda reacción de restricción.

### **Purificación de plásmido (Qiagen plasmid midi kit)**

Este protocolo se basa en una modificación del procedimiento de lisis alcalina, seguida por la unión del ADN plasmídico a la resina de intercambio aniónico bajo condiciones apropiadas de pH y baja concentración de sales. El ARN, proteínas, colorantes e impurezas de bajo peso molecular son removidos por un lavado a concentración media de sales. Posteriormente el ADN plasmídico es eluído con un amortiguador de alta concentración de sales. El plásmido eluato es concentrado y precipitado con isopropanol. La purificación se llevó a cabo mediante el método que marca el sistema comercial.

### **Purificación de ADN a partir de reacciones enzimáticas (Qiagen QIAquick PCR Purification Kit)**

Este protocolo se basa en la unión del ADN a la membrana de sílica en presencia de una alta concentración de sales mientras que los contaminantes pasan a través de la columna. Las impurezas son lavadas eficientemente con un amortiguador con etanol y finalmente el ADN es eluído con amortiguador de elución o agua. La purificación se llevó a cabo mediante el método que marca el sistema comercial, la elución se realizó con agua.

### **Purificación de ADN a partir de gel de agarosa (Qiagen QIAquick Gel Extraction Kit)**

Este protocolo se basa en la disolución del gel con el ADN en un amortiguador con alta concentración de sales a un pH  $\leq 7.5$ , el ADN se une a la membrana de sílica a alta concentración de sales, los contaminantes pasan a través de la columna. Las impurezas son lavadas con un amortiguador que contiene etanol. El ADN es eluído con amortiguador de elución o agua. La purificación se efectuó de acuerdo al método que marca el sistema comercial, la elución se realizó con agua.

### **Miniprep por columna (Qiagen QIAprep Miniprep Kit)**

Este protocolo se basa en la lisis de las bacterias bajo condiciones alcalinas, la posterior neutralización y ajuste a alta concentración de sales, eliminando restos celulares y otros contaminantes por centrifugación. Posteriormente se lleva a cabo la unión del ADN a la membrana de sílica, un lavado con amortiguador que contiene etanol y la posterior elución con amortiguador de elución o agua. La purificación se realizó según las instrucciones señaladas en el sistema comercial, la elución se realizó con agua.

## APÉNDICE B

### Soluciones y amortiguadores utilizados

#### Biología molecular

##### Amortiguador TE

Tris	10 mM
EDTA	1 mM
Ajustar pH 8.5	

##### Amortiguador TENS

Amortiguador TE	1X
NaOH	0.1 N
SDS	0.5%

##### Amortiguador TAE (50X)

	<b>1 L</b>
Trizma Base	242 g
Ácido Acético Glacial	57.1 mL
EDTA 0.5M (pH8.0)	100 mL

##### Amortiguador TAE (1X)

Diluir amortiguador TAE (50X) 1:50 en agua destilada

##### Amortiguador TB **100 mL**

- Pipes 0.3g
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.22g
- KCl 1.86g
  
- Ajustar a pH 6.7 con KOH 1N
- Agregar 1.09g de  $\text{MnCl}_2$
- Esterilizar por filtración con membrana de 0.22  $\mu\text{m}$
- Guardar a 4 °C

##### Medio LB liquido **1 L**

Bactotripton	10g
Extracto de levadura	5g
NaCl	10g
Esterilizar por autoclave a 121°C, 15 lb por 25 min	

**Medio LB sólido** **1 L**  
 Bactotriptona 10 g  
 Extracto de levadura 5 g  
 NaCl 10 g  
 Agar 20 g  
 Esterilizar por autoclave a 121°C, 15 lb por 25 min  
 Dejar enfriar aproximadamente a 50°C \*  
 Vaciar en cajas Petri

\* Agregar antibiótico en caso de ser necesario

### **Medio LB + IPTG y x-gal**

Preparar cajas de medio LB sólido con ampicilina.  
 Agregar 12 µL de una solución 800 mM de IPTG (isopropil-β-D-tiogalactopiranosido)  
 Agregar 20 µL de una solución 50mg/mL de X-Gal (5-Bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactósido)

<b>Antibióticos</b>	<b>Solución madre</b>	<b>Concentración de uso</b>
Ampicilina	100 mg/mL en H <sub>2</sub> O	100 µg/mL
Tetraciclina	50 mg/mL en H <sub>2</sub> O/EtOH 1:1	40 µg/mL

### **Amortiguador de carga DNA (Loading Dye)**

Azul de bromofenol	0.25%
Xilen-cianol FF	0.25%
Glicerol	30%

Disolver en agua y guardar alícuotas a -20°C.

### **Gel de agarosa 1%**

Disolver un gramo de agarosa en 100 mL de amortiguador TAE

### **Bromuro de etidio**

Disolver 100 mg de bromuro de etidio en 10 ml de agua.

## Geles de proteínas

<b>Solución digestora</b>		<b>25 mL</b>
SDS	10%	2.5 g
Glicerol	30%	7.5 g
Tris-HCl	100 mM	1.25 g
Azul de bromofenol	0.3%	75 mg
Mercaptoetanol	4%	1 mL

Ajustar a pH 6.8

<b>Solución madre de acrilamida</b>		<b>100 mL</b>
Acrilamida	30%	30 g
Bis-acrilamida	0.98%	0.98 g

Filtrarla y guardar a 4°C

<b>Amortiguador electroforético</b>		<b>500 mL</b>
Tris	3 M	181.7 g
HCl	1 N	40.3 ml
SDS	0.3%	1.5 g

### Gel de tricina SDS-PAGE (von Jagow)

	Gel separador grande				Gel separador chico		Concentrador	
	10%	12%	14%	16%	12.5%	16%	Grande	Chico
<b>Solución madre de acrilamida</b>	10 ml	12 ml	14 ml	16 ml	3 ml	4 ml	1.6 ml	400 µl
<b>Amortiguador electroforético</b>	16 ml	14 ml	12 ml	10 ml	3.4 ml	2.5 ml	3 ml	750 µl
<b>Glicerol 79.5%</b>	4 ml	4 ml	4 ml	4 ml	1 ml	1 ml		
<b>Agua destilada</b>							7.4 ml	1.85 ml
<b>Persulfato de Amonio 10%</b>	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	25 µl	25 µl	100 µl	25 µl
<b>TEMED</b>	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	2.5 µl	2.5 µl	10 µl	2.5 µl

<b>Amortiguador cátodo</b>		<b>3 L</b>
Tris	0.1 M	36.3 g
Tricina	0.1 M	53.8 g
SDS	0.1%	3 g



<b>Amortiguador cátodo con azul de Coomassie</b>		<b>3 L</b>
Tris	0.1 M	36.3%
Tricina	0.1 M	53.8%
SDS	0.05%	1.5%
Azul de Coomassie (SERVA Blue G)	0.05%	1.5%

<b>Amortiguador ánodo</b>		<b>3 L</b>
Tris-HCl	0.2 M	72.7 g
pH 8.9		

<b>Solución teñidora</b>	
EtOH	50%
Ácido acético	10%
Coomassie Blue R-250	0.1%

**Solución desteñidora**  
10% de ácido acético en agua

**Solución teñidora de rojo de Ponceau**  
0.1% de rojo de Ponceau en 5% de ácido acético

## Purificación de la proteína recombinante

<b>Amortiguador de fosfatos pH 7.8 (PBS)</b>		<b>100 mL</b>
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	50 mM	689.9 mg
NaCl	300 mM	1.7532 g

Ajustar pH a 7.8 y aforar a 100 mL

<b>Amortiguador de guanidina 6 M</b>		<b>100 mL</b>
Guanidina	6M	57.318g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	50 mM	689.9 mg
NaCl	500 mM	2.922 g

Ajustar pH a 7.8 y aforar a 100 mL

<b>PMSF 0.1M inhibidor de proteasas</b>		<b>1mL</b>
PMSF	100 mM	17.42 mg

Disolver en 1 mL de isopropanol

### **Imidazol 1 M**

Disolver 6.8 g de imidazol en 100 mL de agua destilada

### **Resina utilizada**

Resina de níquel unida a sefarosa de la marca Amersham Biosciences.

## Western blot (Inmunoréplica tipo western)

### Amortiguador Negativo

1 L

Ácido  $\epsilon$ -amino-n-caproico 300 mM 39.4 g

SDS 0.05% 0.5 g

Ajustar a pH 8.5 y aforar a 1L

### Amortiguador Positivo

1 L

Tris 150 mM 18.2 g

Tricina 50 mM 9.0 g

MeOH 20% 200 mL

Aforar a 1 L

### Amortiguador salino de Tris (TBS)

1 L

Tris.HCl 20 mM 2.4 g

NaCl 0.5 M 29.2 g

Ajustar pH a 7.5 y aforar a 1 L

### Amortiguador salino de Tris y Tween (TTBS)

1 L

Tris-HCl pH 7.5 20 mM 2.4 g

NaCl 0.5 M 29.2 g

Tween-20 0.05% 0.5 mL

Ajustar pH a 7.5 y aforar a 1 L

### Solución de $\text{NaHCO}_3$ 0.1 M, 1 mM $\text{MgCl}_2$ pH 9.8

$\text{NaHCO}_3$  0.1 M

$\text{MgCl}_2$  1 mM

### BCIP

60 mg de BCIP en 2.8 mL de dimetil formamida (DMF) y 1.2 mL  $\text{H}_2\text{O}$

### NBT

30 mg NBT en 4 mL  $\text{H}_2\text{O}$

### Solución reveladora

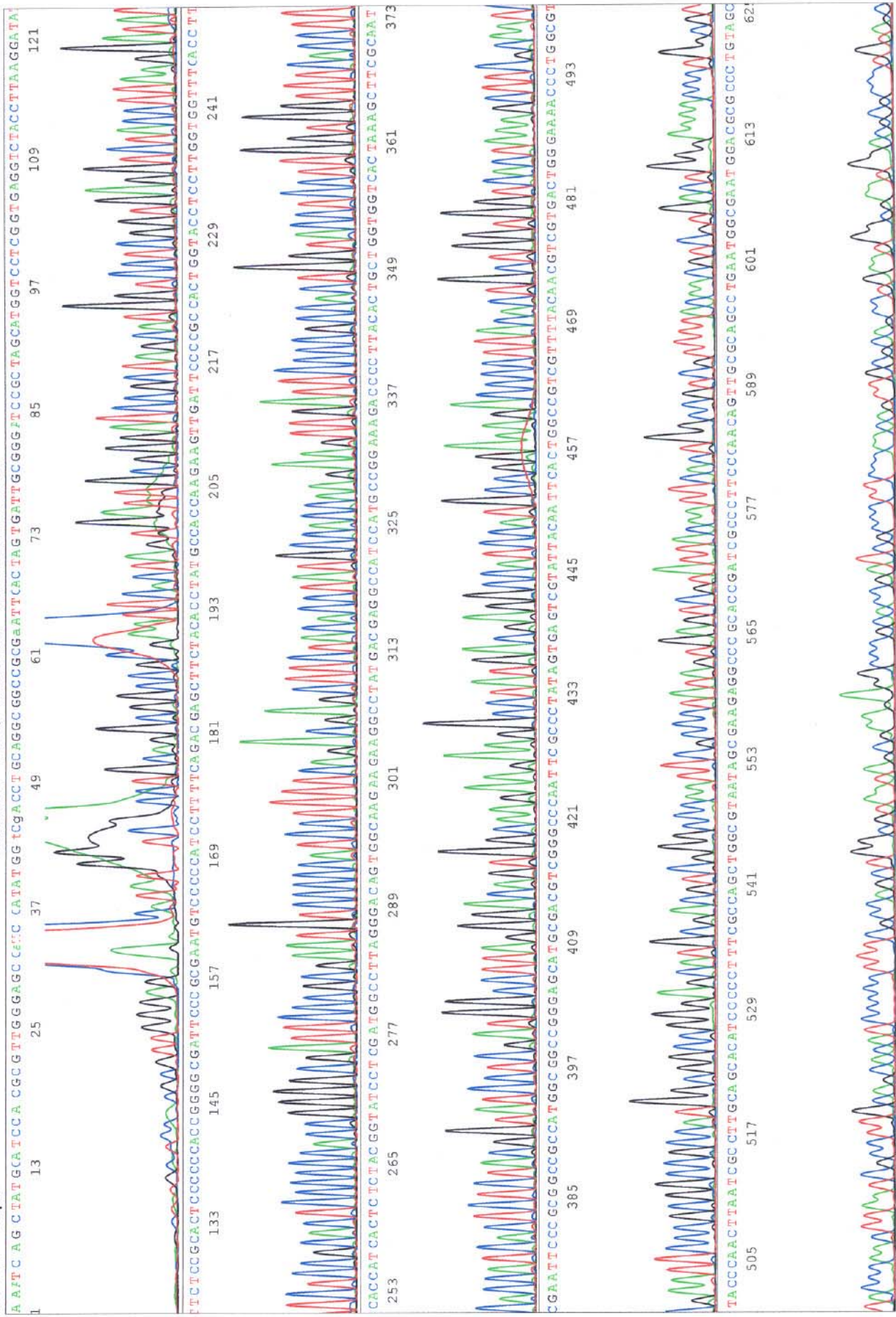
20 mL de solución de  $\text{NaHCO}_3$  0.1 M, 1 mM  $\text{MgCl}_2$  pH 9.8

Adicionar 200  $\mu\text{L}$  de BCIP

Adicionar 200  $\mu\text{L}$  de NTB

## **APÉNDICE C**

**Cromatogramas obtenidos de la secuenciación de la clona pGEM-ASA8 B2  
con cebadores para los promotores SP6 y T7**

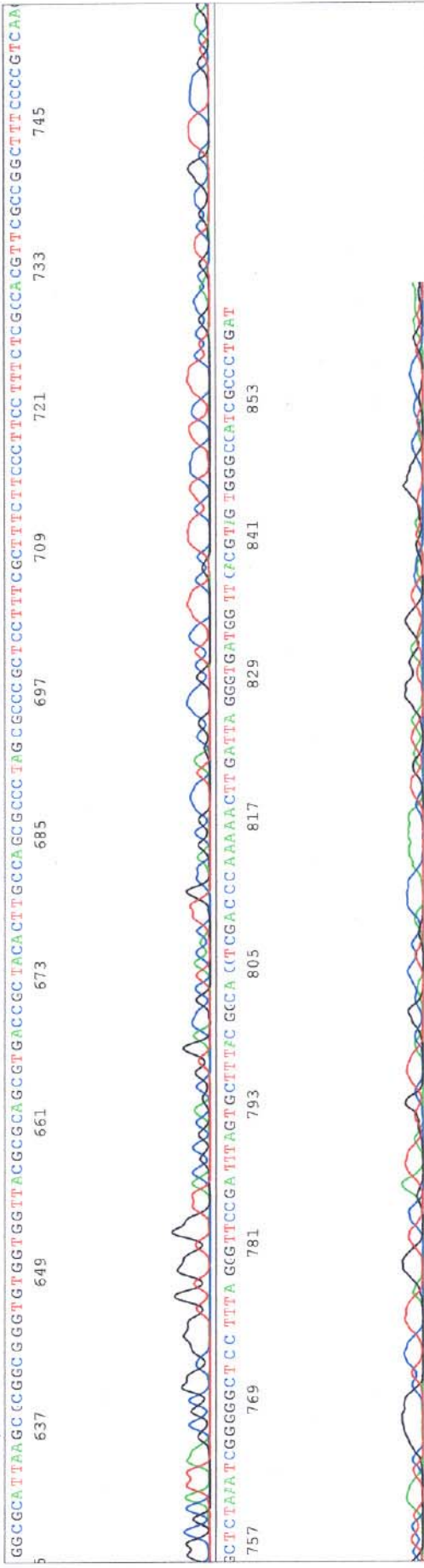


Inst Model/Name 3100/FISIOLOGIACEL-1348-025  
 Dec 11, 2007 12:44PM, CET  
 Dec 11, 2007 01:27PM, CET  
 Spacing: 16.12 Pts/Panel 1500  
 Plate Name: ifc78

pGEM-ASA8-B2\_SP6  
 21417  
 KB\_3100\_POP6\_BDTV3.mob  
 P's 848 to 12450 Pk1 Loc:848

S/N G:151 A:62 T:93 C:113  
 KB.bcp  
 KB 1.1.1 Cap:6

Version 5.1 HISQV Bases: 788 HECTOR MIRANDA





S/N G:1067 A:735 T:905 C:1004

KB.bcp

KB 1.1.1 Cap:5

KB\_3100\_POP6\_BDTV3.mob  
Pts 858 to 1220 Pk1 Loc:858

Version 5.1 HisQV Bases: 775 HECTOR MIRANDA

1 CA CGA TTGGCCAC TGGCCGAG TCGCATG CTCCCGGCGCGG (na) TGGCCGCGCCCGCGG GATTCGATTCGC GAA GCTTTAGTGA CCA CCA GCGAGTGTAA GGGGGTCTTTCCG GCA TGGATGGCCCTCGTCATAGGCCCT  
13 25 37 49 61 73 85 97 109 121

2 TCTTCTGGCCAC TGTCCCTAAAGGCCAT CGAGGATACC GTAGAGTGTGGTGAAGGTGAAAGGTGAA CCA CCA GCGAGTGTAA GGGGGTCTTTCCG GCA TGGATGGCCCTCGTCATAGGCCCT  
133 145 157 169 181 193 205 217 229 241

3 CTGAAA GATGGGGGACATTCGGCGGAA TC GCCCGG TGGGGGGAGT GCGGGGAA TATCC TTTAAGGTAGACCCTACC GAGGACCATGCTAGCGGATCCC GCAATCACA TGAATTC GCGGCC  
253 265 277 289 301 313 325 337 349 361 373

4 GCTGCAGGT CGACCAAT TGGGAGA GCTCCCAACGCGTT GGATGCA TAGCTTGACTATTC TATAGT GTCACCTAAA TAGCTTG GCTAA TCA TGGTCA TGGTCA TGGTCA TGGTCA TGGTCA TGGTCA  
385 397 409 421 433 445 457 469 481 493

5 GC TCACAA TCCACACAA CATACGAGCCGGA AGCA TAAA GTGTAAA GCCCTGGGGT GCC TAA TAGT GAGCTAA CTCAC AT TAA TTGC GTT GC GCTCA TGGCC GCTTCCAG TCGGG ARA CCTG  
505 517 529 541 553 565 577 589 601 613 625

6

Inst Model/Name 3100/FISIOLOGIACEL-1348-025  
 Dec 13,2007 01:07PM, CET  
 Dec 13,2007 01:51PM, CET  
 Spacing:15.77 Pts/Panel1500  
 Plate Name: ifc79

pGEM-ASA8-B2\_T7prom  
 21418R  
 KB\_3100\_POP6\_BDTV3.mob  
 Pts 858 to 12200 Pk1 Loc:858

S/N G:1067 A:735 T:905 C:1004  
 KB.bcp  
 KB 1.1.1 Cap:5

Version 5.1 HISQV Bases: 775 HECTOR MIRANDA

