



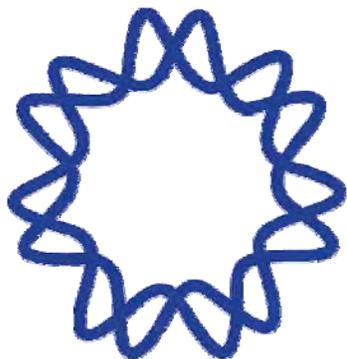
Universidad Nacional Autónoma de México

Instituto de Biotecnología

**Expresión heteróloga de la ACCO de
Arabidopsis thaliana en *Escherichia coli*: hacia
la producción catalítica de etileno**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS
P R E S E N T A :

Biol. José Francisco Gasteazoro Piñeiro



Tutora: Dra. Brenda Valderrama Blanco

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este proyecto se llevó a cabo en el Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la Dra. Brenda Valderrama Blanco.

Agradecemos al laboratorio de Biociencias de la Universidad Paul Cezanne (Aix Marsella III) por las facilidades prestadas durante la estancia de investigación. En particular a Nadia El Bakkali Taheri y a la Dra. Jalila Simaan por su invaluable cooperación. También agradecemos la asistencia técnica de Guadalupe Paredes Váldez y de Raunel Tinoco Valencia.

Este proyecto fue financiado por DGAPA-UNAM IN202407 y por SEP-Conacyt 50581.

Índice General

ÍNDICE GENERAL	- 0 -
ÍNDICE DE TABLAS, FIGURAS Y GRAFICAS	- 0 -
RESUMEN	- 1 -
INTRODUCCIÓN	- 2 -
1. ACTIVACIÓN ENZIMÁTICA DEL OXÍGENO	- 2 -
2. DAÑO CELULAR POR OXIDACIÓN	- 4 -
3. IONES METÁLICOS EN BIOLOGÍA (QUÍMICA BIOINORGÁNICA)	- 6 -
4. ENZIMAS CON HIERRO NO HÉMICO	- 10 -
4.1.1 LA ACCO	- 17 -
4.1.2 DISECCIÓN DEL MECANISMO CATALÍTICO	- 19 -
4.1.3 INCONSISTENCIAS DEL MECANISMO CATALÍTICO	- 22 -
4.1.4 DEL MECANISMO DE DESACTIVACIÓN	- 24 -
5. EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA ACCO	- 28 -
HIPÓTESIS	- 31 -
OBJETIVOS	- 31 -
MATERIALES Y MÉTODOS	- 32 -
1. ELECTROFORÉISIS	- 32 -
2. CEPAS Y MEDIOS DE CULTIVO.	- 32 -
3. PURIFICACIÓN DE DNA PLASMÍDICO.	- 33 -
4. ANÁLISIS BIO-INFORMÁTICO DE LA ACCO	- 33 -
5. REACCIONES DE AMPLIFICACIÓN.	- 33 -
6. CONSTRUCCIÓN DE LOS VECTORES.	- 34 -
7. CAMBIO DE USO DE CODONES.	- 35 -
8. TRANSFORMACIÓN DE <i>E. COLI</i>.	- 38 -
9. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LA ACCO, ACCO-HIS Y ACCO-METIS.	- 38 -
10. INMUNO DETECCIÓN TIPO "WESTERN BLOT"	- 38 -
11. PURIFICACIÓN.	- 40 -
12. ENSAYOS DE ACTIVIDAD	- 40 -
RESULTADOS	- 42 -

ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO.	- 42 -
CLONACIÓN DE LA ACCO	- 43 -
EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA ACCO	- 52 -
ESTIMACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	- 54 -
CONSUMO DE OXÍGENO	- 55 -
PRODUCCIÓN DE CN⁻	- 57 -
PRODUCCIÓN DE ETILENO	- 57 -
<u>DISCUSIÓN</u>	- 60 -
<u>CONCLUSIONES</u>	- 65 -
<u>PERSPECTIVAS</u>	- 66 -
<u>REFERENCIAS</u>	- 68 -

Índice de Tablas, Figuras y Graficas

Fig. 1. Esquema de reducción del oxígeno molecular en ausencia (A) y presencia de metales de transición (B). (Klinman, 2007).....	- 4 -
Tabla 1. Iones metálicos de importancia biológica (Modificado de Holm, et al. 1996).....	- 8 -
Tabla 2. Principales geometrías del hierro de importancia biológica.....	- 11 -
Fig. 2. A) Representación esquemática de la triada catalítica 2H-1C (X, Y y Z denotan moléculas de solvente débilmente unidas o sitios vacantes) (Bruijninx et al., 2008) B) Sitio activo de la ACCO de <i>Pethunia x. hybrida</i> (Zhang et al., 2004).	- 12 -
Fig. 3. Reacciones catalizadas por las cinco familias de enzimas mononucleares con Fe ^{II} no hémico 2H-1C (modificado de Koehntop, et.al. 2005).....	- 14 -
Fig. 4. Mecanismo catalítico de las intradiol dioxigenasas (Pau, et al. 2007).....	- 16 -
Fig. 5. Mecanismo general para las reacciones catalizadas por la familia de proteínas con motivo estructural 2H-1C (Bruijninx, et al. 2008).....	- 17 -
Fig. 6. Comparación de secuencias de la ACCO de interés con las ACCO's mejor caracterizadas. Los rombos marcan los residuos que coordinan al Fe.....	- 19 -
Fig. 7. Mecanismo catalítico propuesto para la ACCO.....	- 20 -
Fig. 8. Mecanismo catalítico propuesto por Thrower (Bruijninx, et al. 2008).	- 24 -
Fig. 9. Cinética de desactivación de la ACCO de jitomate (El Bakkali y Simaan, comunicación personal)-	25
-	
Fig. 10. Fragmentación de la ACCO después de 5 minutos de incubación.	- 27 -
Carril 1 sin tratamiento,	- 27 -
Carril 2 ACCO/Fe/ácido ascórbico,.....	- 27 -
Carril 3 ACCO/Fe/ácido ascórbico/ACC.....	- 27 -
Adaptado de (Barlow et al.,1997).	- 27 -
Fig. 11. Metodología para generar la polimutante pGEM-MegR.....	- 37 -
Fig. 12. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos producto del blast contra el genoma de <i>A. thaliana</i> -	42 -
Tabla 3. Porcentaje de similitud para la secuencia de aminoácidos.....	- 43 -
Gráfica 1. Comparación de la frecuencia del uso de codones para (azul) <i>A. thaliana</i> y (negro) <i>E. coli</i> . -	45 -
Fig. 13. Representación esquemática del pRARE incluido en Rosetta. En la tabla del lado izquierdo se leen los codones problema que se encuentran en la secuencia de la ACCO de <i>A. thaliana</i> así como su presencia en pRARE.....	- 47 -
Fig. 14. SDS-PAGE pruebas de expresión con Rosetta. Los primeros dos carriles corresponden a la cepa hospedera y los siguientes dos a la cepa con la construcción pETA13.....	- 47 -
Fig. 15. Inmunoensayo de las fracciones soluble e insoluble de (WT) <i>E. coli</i> Rosetta, (pET) Rosetta transformada con pET-32a(+), (pETA13) Rosetta transformado con la construcción pETA13, (pETHis) Rosetta transformada con la construcción pET-Ahis, y (C+) una proteína que da positivo para el anticuerpo anti-His. En todos los caso el asterisco denota la fracción insoluble.....	- 48 -
Fig. 16. Alineamiento de secuencia de aminoácidos de la ACCO de <i>A. thaliana</i> comparada con las construcciones pET-MEGA9, pET-A13 y pET-Ahis13.....	- 50 -
Fig. 17 Alineamiento de la secuencia obtenida para la polimutante pGEM-MEGR.....	- 51 -
Fig. 18. SDS-PAGE pruebas de expresión para (Pet) cepa hospedera transformada con pET-32a(+), (A13) Rosetta transformada con la construcción pET-A13, (Ahis) Rosetta transformada con la construcción pET-Ahis, y (Metis) Rosetta transformada con la polimutante Metis.....	- 52 -
Fig. 19. SDS-PAGE Fracciones seleccionadas de los diferentes pasos de purificación.....	- 53 -

Fig. 20. Inmuno ensayo de la proteína obtenida después de la purificación contra el anticuerpo anti-ACCO de jitomate. (ACCot) ACC oxidasa de jitomate, (ACCO A. thaliana) ACCO obtenida de la purificación de Rosetta transformada con la construcción pMetis..... - 54 -

Gráfica 3. Prueba de actividad de consumo de oxígeno; A) Actividad específica de la ACCO en términos de consumo de oxígeno; (+ACC) mezcla de reacción con ACC y (-ACC) mezcla de reacción sin ACC. B) Porcentaje de actividad al sustraer la reacción de fondo..... - 56 -

Gráfica 4. Prueba de actividad producción de CN. (+ACC) mezcla de reacción con ACC y (-ACC) mezcla de reacción sin ACC. - 57 -

Tabla 4. Datos de la actividad de producción de etileno. El área bajo la curva es la integración del pico obtenido en el tiempo de retención esperado para el etileno; ND (no detectado) denota la ausencia de señal en los cromatogramas..... - 58 -

Resumen

El etileno es una fitohormona involucrada en procesos clave dentro de la biología de plantas dentro de los cuales destacan la germinación de las semillas, la senescencia y la maduración de frutos. La vía de biosíntesis del etileno en plantas superiores consiste comprende las siguientes conversiones: metionina → S-adenosil-L-metionina → ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) → etileno. El último paso de esta ruta es catalizada por la ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico oxidasa (ACCO) con la concomitante reducción de oxígeno a agua. La ACCO pertenece al grupo de enzimas con hierro no hémico caracterizadas por el motivo 2 Histidinas – 1 Ácido carboxílico (2H-1C) como ligantes del hierro. Dos de los cuatro electrones requeridos para la reducción de oxígeno a agua son provistos por el ACC mientras que los otros dos electrones provienen del ascorbato, esta característica es única de la ACCO ya el resto de las enzimas de la familia utilizan de manera α -cetoglutarato como co-sustrato donador de electrones.

A pesar del papel fundamental de la ACCO durante el desarrollo y ciclo de vida de plantas, su mecanismo catalítico no ha sido todavía comprendido a la perfección. El análisis de los productos de la reacción permitió establecer la estequiometría de ésta como: $\text{ACC} + \text{O}_2 + \text{ácido ascórbico} \rightarrow \text{etileno} + \text{CN}^- + \text{CO}_2 + \text{dehidroascorbato} + 2\text{H}_2\text{O}$, dependiente de bicarbonato. La principal inconsistencias radica en la dificultad para establecer un modelo universal del ciclo catalítico, en particular el orden de entrada de los sustratos al sitio catalítico así como la asignación de uno de los co-sustratos secundarios (CO_2 o bicarbonato).

Con la finalidad de analizar el ciclo catalítico de la ACCO proponemos la utilización de la isoenzima de *Arabidopsis thaliana*. En este trabajo obtuvimos una preparación estable de ACCO mediante la expresión heteróloga de la ACCO de *A. thaliana* en *E. coli*. Se establecieron las condiciones para la sobreexpresión, así como las condiciones de purificación para favorecer la retención del centro metálico en el centro activo de la proteína garantizando su conformación nativa.

Los resultados obtenidos en este estudio indican que es posible la obtención de la ACCO recombinante con un pureza electroforética de aproximadamente 90%, así como el establecimiento de un protocolo de purificación en el cual una fracción de la mezcla obtenida se encuentre en la forma holo. Usando esta preparación fue posible observar el consumo de oxígeno y la producción de etileno y de cianuro, todos estos dependientes del sustrato ACC. Adicionalmente, nuestros datos catalíticos apuntan a una disparidad en la estequiometría establecida para la reacción sugiriendo la necesidad de revisar el ciclo catalítico.

Introducción

1. Activación enzimática del Oxígeno

El surgimiento de las primeras células fotosintéticas sobre la Tierra hizo posible la progresión del medio ambiente de anaeróbico a aeróbico. La capacidad de los organismos fotosintéticos de generar oxígeno molecular (O_2) a partir de la ruptura de una molécula de agua acarrió la introducción de un nuevo componente (potencialmente tóxico) al medio. Durante las primeras etapas de la transición de una atmósfera reductora a una oxidante, el oxígeno producido comenzó a reaccionar con una vasta cantidad de iones hierro reducido disueltos en los mares, oxidándolos hasta su forma férrica. Se estima que fueron necesarios cerca de dos mil millones de años para que la acumulación de oxígeno en la atmósfera pudiera llegar hasta un estado estacionario parecido al actual (Klinman, 2001; Williams and Frausto da Silva, 2004). La posterior diseminación de los organismos aeróbicos se deriva de una presión de selección sobre los organismos existentes durante el cambio de atmósfera, inclinada a favorecer termodinámicamente a los organismos capaces de reducir el oxígeno a agua y obtener de esta manera una gran cantidad de energía (Klinman, 2001; Klinman, 2007). Es así como se establece el ciclo biogeoquímico del oxígeno, en donde la fotosíntesis oxigénica y la respiración forman un ciclo continuo de oxidación del agua y reducción del oxígeno.

El oxígeno (O_2) es un birradical, esto es, tiene dos electrones libres o desapareados. Debido a que estos electrones poseen el mismo giro o espín, solo interactúan de manera efectiva con compuestos que contengan dos electrones libres con el giro opuesto; dado que esta última condición es poco frecuente, el oxígeno no es muy reactivo a temperatura ambiente. Las configuraciones electrónicas del carbono y del oxígeno no favorecen la inserción concertada del oxígeno a sustratos orgánicos a menos que se inserte un primer electrón para su activación; se dice por lo tanto que el espín del oxígeno limita su reactividad (Sawyer, 1991). A pesar de esto, la gran cantidad de energía liberada mediante la oxidación de compuestos orgánicos hace evidente sus ventajas para los organismos aeróbicos, siendo un factor determinante en la evolución de los organismos hacia medios de vida más complejos. De esta manera, los organismos tuvieron que adaptarse a que la mejor fuente energética fuera la reducción de oxígeno molecular a agua, siendo, como se había mencionado, la habilidad para

explotar esta reacción una fuerte presión de selección en el curso de la evolución (Klinman, 2001; Hansberg, 2002; Valderrama *et al.*, 2007).

La química de la reducción de oxígeno (O₂) a agua involucra la adición secuencial de cuatro electrones tal como se puede observar en la Figura 1A. Los compuestos intermediarios (especies de oxígeno parcialmente reducidas), superóxido, peróxido de hidrógeno e hidroxilo son más reactivos que el oxígeno, siendo el radical hidroxilo el más reactivo de todos ($k = 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) reaccionando prácticamente con cualquier compuesto en el sitio en donde se produce. El estudio de estos intermediarios, conocidos como especies reactivas de oxígeno (ROS¹ por sus siglas en inglés) es de gran importancia debido a que son capaces de generar daño por oxidación en las proteínas, DNA y otros componentes celulares (Sawyer, 1991). Los radicales libres en general, y los de oxígeno en particular, pueden generarse por la ruptura homolítica de enlaces covalentes o como sub-producto de reacciones de transferencia de electrones, desde la formación deliberada y altamente controlada dentro de los sitios activos de algunas enzimas hasta los que se forman de manera no intencionada por la exposición a diferentes tipos de radiación (Sawyer, 1991; Hawkins and Davies, 2001). Los radicales libres suelen tener una vida corta pues reaccionan rápidamente con diversos blancos que rescatan el radical (Hawkins and Davies, 2001; Davies, 2005).

El control en la reactividad de los intermediarios de oxígeno parcialmente reducidos es una característica trascendental dentro de la vida aeróbica, sin embargo, no están claros los lineamientos de cómo es que las células evaden el daño oxidante intenso ocasionado por las ROS.

¹ Las especies reactivas de oxígeno (O₂) son especies más reactivas que éste en su estado basal de triplete. Las principales son: las especies que son producto de la ruptura u oxidación de la excitación del O₂, o sea, el oxígeno atómico, el ozono y el oxígeno en singulete, y las especies de oxígeno que están parcialmente reducidas, esto es, el superóxido, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo. Además de las especies de oxígeno reactivas mencionadas, en la última década de los 90's se descubrió que hay otras especies de oxígeno combinadas con el nitrógeno que son importantes en la biología tal es el caso del óxido nítrico (Thrower *et al.*, 2006).

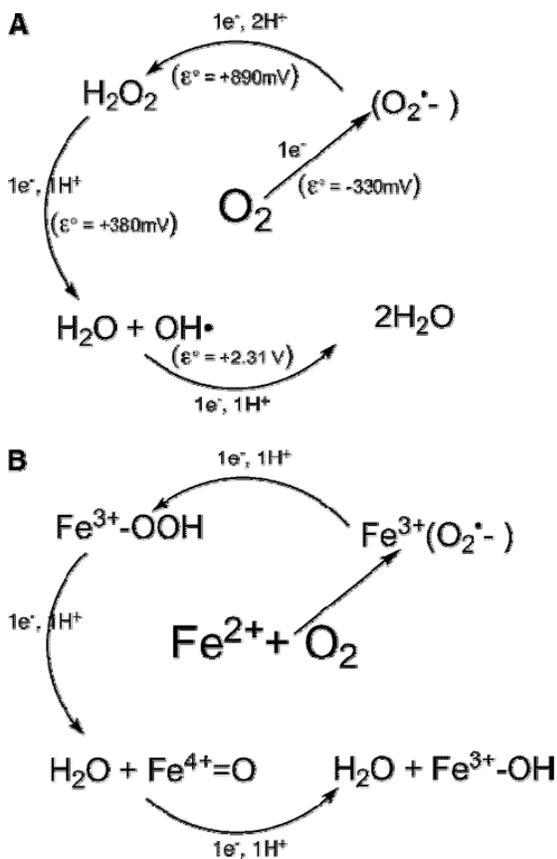


Fig. 1. Esquema de reducción del oxígeno molecular en ausencia (A) y presencia de metales de transición (B). (Klinman, 2007)

2. Daño celular por oxidación

Las ROS atacan a casi todos los componentes celulares siendo las proteínas especialmente susceptibles ya que tanto la cadena principal como las laterales pueden actuar como donadores de electrones y por lo tanto tienen la capacidad de alojar una diversidad de radicales (Hawkins and Davies, 2001; Valderrama *et al.*, 2002). El superóxido y el peróxido pueden participar en una amplia variedad de reacciones de oxido-reducción, hidrolíticas, transferencia de átomos y dismutación; siendo en su mayoría reacciones reversibles con implicaciones en la regulación de la actividad enzimática (Sawyer, 1991). En cambio, el radical hidroxilo causa la mayoría de los daños irreversibles en las proteínas, ya que reacciona con cualquier aminoácido en el sitio en donde se forma (generalmente cercano a un metal de transición, por sus propiedades reactivas en presencia de O_2). Siendo el radical hidroxilo el más reactivo, es importante mencionar el tipo de reacciones que lleva a cabo (Halliwell and Gutteridge, 1984; Farr and Kogoma, 1991):

I. Abstracciones de un átomo de hidrógeno en posiciones cercanas a grupos deslocalizantes (estabilizantes) como son grupos hidroxilo (Ser, Thr), funciones carboxilo y amida (Asp, Glu, Asn y Gln) y en grupos guanidino (Arg).

II. Adiciones, generalmente en anillos aromáticos de Phe, Tyr, Trp e His, también en los átomos de azufre de Met y Cys (usualmente estas reacciones son más rápidas que las abstracciones ya que el estado de transición no involucra la ruptura de un enlace).

III. Transferencia de electrones (oxidación del carbono- α del esqueleto o reducción de los sustratos) (Halliwell and Gutteridge, 1984).

Actualmente se considera que los organismos aeróbicos poseen tres líneas de defensa para contender con las ROS y evitar el daño oxidante: El uso de enzimas capaces de disminuir y contraatacar las especies reactivas, p. ej. catalasa, glutatión peroxidasa, o superóxido dismutasa. Interruptores de reacciones en cadena de radicales libres de alto o bajo peso molecular como tioredoxina, tocoferol, carotenoides y ubiquinonas. Y por último, trampas de alto peso molecular para metales de transición como lactoferrinas y transferrinas (Valderrama *et al.*, 2007).

Las ROS son tóxicas para la célula y se encuentran involucradas como precursores asociados a diferentes enfermedades y en el envejecimiento. En el último caso, existe una serie de evidencias que relaciona a las ROS con la acumulación de enzimas en formas menos activas o con plegamientos inestables: a) experimentos *in vitro* exponiendo enzimas a ROS generan cambios en la actividad catalítica, estabilidad térmica y susceptibilidad proteolítica similar a la que ocurre durante el envejecimiento; b) la exposición prolongada en animales a estrés oxidante conduce a alteraciones enzimáticas similares a las que ocurren en el envejecimiento; c) animales viejos son más susceptibles que animales jóvenes a daño en proteínas en presencia de un estrés oxidante (ej. rayos X); d) existe un incremento en el contenido de proteínas carboniladas con la edad en cerebros humanos y de gerbos, en cristalino, en hepatocitos de rata y en todo el cuerpo de moscas; e) el contenido de proteínas carboniladas en cultivos de fibroblastos humanos se incrementa exponencialmente en función de la edad del donador de fibroblastos (Berlett and Stadtman, 1997).

La acumulación de proteínas oxidadas (carboniladas) se encuentra asociada a diferentes condiciones patológicas incluyendo esclerosis amiloide lateral, Alzheimer, síndrome de insuficiencia respiratoria, distrofia muscular, cataratas, artritis reumatoide,

progeria, síndrome de Werner y síndrome de Refsum (Konigsberg Fainstein, 2008). También existen indicios de su participación en otros padecimientos como aterosclerosis, diabetes, Parkinson, hipertensión, fibrosis quística y colitis ulcerante (Berlett and Stadtman, 1997). El nivel de proteínas oxidadas es, finalmente, un reflejo del balance entre la tasa de oxidación y la tasa de degradación. Este balance es una función compleja de diversos factores que conducen a la generación de radicales libres, así como de los factores que determinan la concentración y/o actividad de los sistemas de degradación (usualmente asociados a proteasas) de proteínas con daño oxidante (Berlett and Stadtman, 1997). El daño causado por las ROS puede ser contrarrestado mediante sistemas de recambio y reparación, por ejemplo, sintetizando elevadas cantidades para reemplazar a aquellas proteínas que han sido dañadas (Farr and Kogoma, 1991). Sin embargo, ésta no parece ser la mejor forma ya que es muy costosa.

Recientemente se propuso que el daño oxidante podía ser reducido utilizando eficientemente los co-factores enzimáticos como catalizadores redox (Valderrama *et al.*, 2002). Con la finalidad de hacer más efectiva la transferencia de electrones, las enzimas tienden evolutivamente hacia la incorporación de co-factores redox, dichos co-factores pueden ser orgánicos (ej. Flavinas, pterinas y quinonas) o metálicos. En contraste con la reacción basada en co-factores orgánicos, la incorporación de metales de transición hace posible la disminución del daño confinando las ROS a su entorno (Klinman, 2007), propiedad cimentada en la formación de intermediarios unidos covalentemente dentro de la esfera de coordinación. Como se muestra en la figura 1B para las enzimas acopladas a hierro, el centro metálico altera la naturaleza de los intermediarios en la reducción del oxígeno, y como consecuencia, se tienen especies con tiempos de vida mayores y una reactividad más controlada que aquellas que se generan en ausencia de metales (Valderrama *et al.*, 2007).

3. Iones metálicos en biología (química bioinorgánica)

La ocurrencia de centros metálicos en los sitios activos de las proteínas es un fenómeno generalizado (Holm *et al.*, 1996; Degtyarenko, 2000; Solomon *et al.*, 2000; Williams and Frausto da Silva, 2004; Koehntop *et al.*, 2005). El reclutamiento de metales proveyó a las proteínas de propiedades químicas diferentes a las propiedades de los elementos propios de las cadenas polipeptídicas como por ejemplo la capacidad de llevar a cabo reacciones de oxido-reducción de

manera reversible. Las metaloproteínas participan en los procesos bioquímicos más importantes incluyendo la respiración, fijación de nitrógeno y la fotosíntesis oxigénica; la importancia de estos centros metálicos queda en evidencia al ser eliminados o sustituidos por otro metal, derivando en la pérdida total de la función biológica o en una disminución notoria de la actividad (Holm *et al.*, 1996). Se ha estimado que aproximadamente un tercio de las enzimas purificadas a homogeneidad requieren de co-factores metálicos para llevar a cabo una función biológica. Los metales que se encuentran en sistemas biológicos son magnesio, calcio, todos los miembros de la primera serie de metales de transición (excluyendo al escandio, titanio y cromo), molibdeno, tungsteno, cadmio y mercurio. Estos metales, ya sea individualmente o como parte de ensamblajes más complejos, constituyen los grupos prostéticos que se observan unidos a los esqueletos polipeptídicos mediante ligantes endógenos constituidos por las cadenas laterales de los aminoácidos (Holm *et al.*, 1996; Degtyarenko, 2000; Baker *et al.*, 2003; Dokmanic *et al.*, 2008).

Por lo anterior, la definición de una metalo-proteína sería aquella proteína que posee un metal como grupo prostético. Este metal suele estar coordinado a través de su primera esfera de coordinación y puede o no encontrarse unido directamente a la proteína. Las proteínas generalmente coordinan los iones metálicos mediante ligantes endógenos constituidos por nitrógeno, oxígeno o azufre. Existen tres clases de grupos funcionales derivados de la cadena polipeptídica que se pueden utilizar como ligantes:

- i) Cadenas laterales- amida (Asn, Gln), amino (Lys), carboxilo (Asp, Glu), hidroxilo (Ser, Thr), imidazol (His), fenol (Tyr), selenol (Sec), sulfuro (Met) y tiol (Cys)
- ii) Carbonilo y amida de la cadena principal
- iii) Amino del N-terminal
- iv) Carboxilo del C-terminal

Aquellos ligantes que no derivan de la cadena polipeptídica son llamados ligantes exógenos y abarcan desde simples formaciones inorgánicas (ej. óxidos, hidróxidos, sulfuros, agua y otras moléculas derivadas de los solventes o ligantes fisiológicos como el oxígeno y el óxido nítrico) hasta compuestos orgánicos N-heterocíclicos (ej. porfirinas) (Holm *et al.*, 1996).

La coordinación de un ión metálico en una proteína es dependiente de la naturaleza y valencia de los orbitales de los ligantes (particularmente su estado de protonación, dependiente del pH del medio), así como de la carga efectiva de los núcleos, número de coordinación y geometría del ion metálico. Las distancias observadas en el enlace metal-ligante suelen ser mucho más flexibles que las que se observan con moléculas orgánicas lo cual dificulta las predicciones. Usualmente se considera que los iones metálicos unidos a su ligante poseen una valencia predominante de dos, ésta valencia depende del número de coordinación y de los residuos de aminoácidos que se encuentren participando en el enlace y difiere de ion metálico a ion metálico (Holm *et al.*, 1996). En la tabla 1 se enlistan los estados de oxidación, números de coordinación y el espín de los metales con importancia biológica.

Tabla 1. Iones metálicos de importancia biológica (Modificado de Holm, *et al.* 1996)

Metal	Estados comunes de oxidación	d ⁿ	Numero de coordinación común	Espín (S)
V	2	d ³	6	3/2
	3	d ²	6	1
[VO]²⁺	4	d ¹	5	1/2
			6	1/2
[VO₂]⁺	5	d ⁰	6	0
Mn	2	d ⁵	4	5/2
			5	5/2
			6	1/2
			6	5/2
	3	d ⁴	5	2
			6	1
			6	2
			6	2
Fe	4	d ³	4	3/2
			6	3/2
			6	2
			6	2
	2	d ⁶	4	2
			5	2
			6	0
			6	2
3	d ⁵	4	5/2	
		5	5/2	
		5	3/2	
		6	1/2	
			6	5/2

	4	d^4	6	1
Co			4	3/2
	2	d^7	5	3/2
			6	1/2
				3/2
	3	d^6	6	0
			2	
Ni			4	1
	2	d^8		0
			5	1
				0
	3	d^7	4	1/2
			5	1/2
		6	1/2	
	4	d^6	6	3/2
			0	
Cu			2	0
	1	d^{10}	3	0
			4	0
			6	0
			4	1/2
	2	d^9	5	1/2
		6	1/2	
	3	d^8	6	1
Zn			4	0
	2	d^{10}	5	0
			6	0
Cd			4	0
	2	d^{10}	5	0
			6	0
Hg			2	0
	2	d^{10}	4	0
			6	0
Mo	3	d^3	6	3/2
	4	d^2	6	1
[MoO]³⁺			4	1/2
	5	d^1	5	1/2
			6	1/2
[MoO₂]²⁺			4	0
	6	d^0	6	0

W	4	d^2	6	1
[WO]³⁺	5	d^1	5	1/2
			6	1/2
[WO₂]²⁺	6	d^0	4	0
			5	0
			6	0

La función que despliega el ion metálico dentro de las proteínas puede ser clasificada dentro de cinco diferentes tipos indicativos:

- Estructural - participando en la configuración de la estructura terciaria y/o cuaternaria.
- Almacenamiento - mediante captación, unión y liberación de los metales de manera soluble.
- Transferencia de electrones - toma, liberación y almacén de electrones.
- Unión a oxígeno molecular - coordinación del O₂.
- Catálisis - unión de sustratos, activación y recambio.

4. Enzimas con hierro no hémico

El hierro es el cuarto elemento en abundancia en la corteza terrestre, y después del aluminio, es el segundo metal más abundante. Puede existir en diferentes estados de oxidación (de -II a +VI), los principales estados son +II (d^6) y +III (d^5). El Fe^{III} es un ácido fuerte de Lewis y tiene como ligante preferencial un oxígeno mientras que el Fe^{II} está entre fuerte y débil, favoreciendo nitrógeno y azufre como ligantes (Crichton and Pierre, 2001). El número de coordinación más frecuente es de seis (complejos octaédricos) aunque también se encuentran complejos de cuatro (tetraédrico) y de cinco coordinaciones (trigonal bi-piramidal o pirámide de base cuadrada). Para los compuestos octaédricos se pueden distinguir dos estados de espín (bajo espín con ligantes de campo fuerte y alto espín con ligantes de campo débil) (Tabla 2). Como metal de transición, el hierro posee propiedades redox y de unión a ligantes de mucha utilidad, por lo que no sorprende encontrarlo como un elemento esencial en multitud de proteínas con diversas funciones (Crichton and Pierre, 2001).

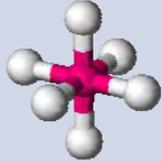
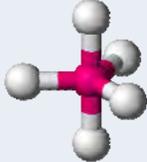
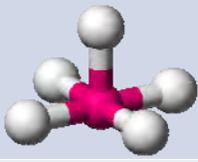
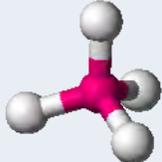
Número de coordinación	Geometría	Representación
6	Octaédrico (oh)	
5	Trigonal bi-piramidal (tbp)	
5	Pirámide de base cuadrada (pbc)	
4	Tetraédrico (th)	

Tabla 2. Principales geometrías del hierro de importancia biológica

Los estados de oxidación Fe^{II} y Fe^{III} son estables y participan en los sistemas biológicos, determinando su versatilidad dentro de la reactividad. Las propiedades del Fe^{II} y del Fe^{III} dependen del espín y reflejan el uso diferencial del estado de oxidación en las enzimas dependientes de hierro: sitios con hierro mononuclear pueden utilizar el Fe^{II} para promover la activación del oxígeno molecular o el Fe^{III} para promover la activación del sustrato. Un análisis de la primera esfera de coordinación de este tipo de sitios indica que la estabilidad relativa del Fe^{II} o del Fe^{III} puede modularse dependiendo de los ligantes (por ejemplo, la unión a Tyr favorece la forma oxidada). Cabe resaltar que ambos estados de oxidación se encuentran generalmente en su forma de alto espín y por lo general se encuentran acoplados en sitios binucleares de manera antiferromagnética. Según Andreini *et al.*, el hierro es mayoritariamente utilizado como un centro redox-activo, cambiando entre dos (o más) formas redox en procesos de transferencia de electrones o catálisis enzimática (Andreini *et al.*, 2009). El cambio en el estado redox del hierro ocasiona cambios en la geometría de coordinación del metal dentro de las proteínas. Podría pensarse que estos cambios provocarían cambios conformacionales en las

proteínas energéticamente desfavorables, sin embargo, ahora sabemos que solo involucran una reorganización mínima debido a sus geometrías distorsionadas (Vallee and Williams, 1968).

La particular reactividad que se observa en los centros metálicos es debida a configuraciones inusuales en el entorno microscópico, químico y conformacional, que conlleva a geometrías distorsionadas. Tal estado distorsionado impone lo que Valle y Williams llaman "estados entáticos" que son conformaciones estables cercanas al estado de transición. La arquitectura propia de las proteínas obliga al metal a adoptar geometrías atípicas, por lo cual dentro de las metaloproteínas se debe de considerar al metal y sus ligando de forma conjunta para la descripción del estado entático (Vallee and Williams, 1968). El estado de éntasis produce una mayor reactividad durante la transferencia de electrones o la catálisis enzimática de lo que se esperaría para una geometría convencional (Crichton, 2008).

En un análisis bio-informático reciente en donde se clasifica a las diferentes metaloproteínas con hierro no hémico, se postulan cinco diferentes grupos, uno de los cuales lo conforman una serie de proteínas que presentan el mismo plegamiento llamado DSBH (Double Stranded β -Helix, por sus siglas en ingles), con el sitio de hierro colocado de forma invariable en un extremo del plegamiento (Andreini *et al.*, 2009). Todas las enzimas incluidas en este grupo se caracterizan por un motivo mononuclear de Fe^{II} no hémico. El hierro divalente se encuentra coordinado por tres ligantes endógenos conformado por dos His localizadas en dos hojas β adyacentes y un residuo ácido (Asp o Glu) localizado en una asa dos posiciones después de la His amino-terminal. Este arreglo denominado 2H-1C, consiste en tres ligantes endógenos en los vértices de una fase triangular en una coordinación octaédrica (Fig. 2).

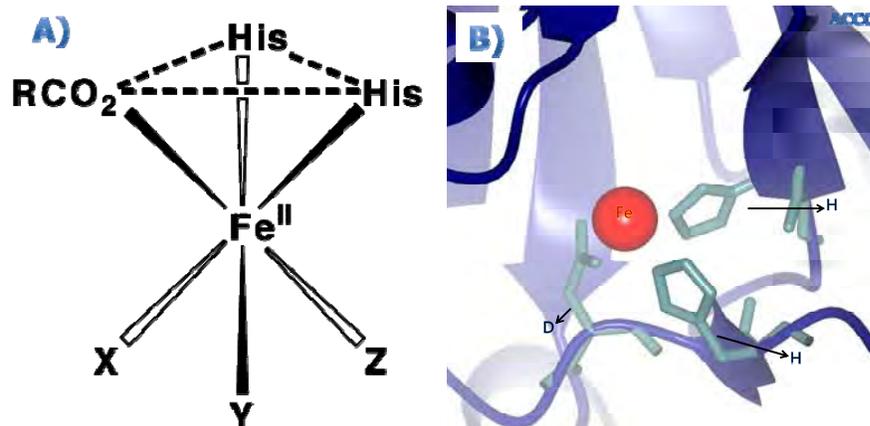


Fig. 2. A) Representación esquemática de la triada catalítica 2H-1C (X, Y y Z denotan moléculas de solvente débilmente unidas o sitios vacantes) (Bruijninx *et al.*, 2008) B) Sitio activo de la ACCO de *Pethunia x. hybrida* (Zhang *et al.*, 2004).

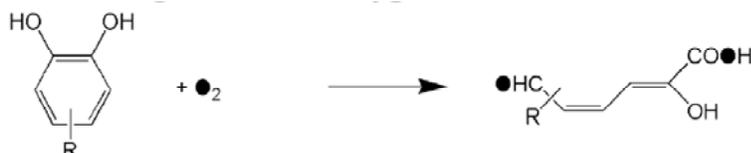
Esta forma de coordinación del hierro hace claro contraste con las enzimas que poseen un grupo hemo, el cual tiene cuatro sitios ocupados por la porfirina y un sitio axial ocupado por la cadena lateral de un residuo de histidina (Kovaleva and Lipscomb, 2008). Por su parte, el centro metálico de las enzimas con hierro no hémico posee tres sitios de coordinación libres para coordinar ligantes exógenos como son el oxígeno, el sustrato y/o un co-factor; dotando a estas proteínas la plasticidad necesaria para modular la reactividad del centro Fe^{II} (Holm *et al.*, 1996; Solomon *et al.*, 2000; Costas *et al.*, 2004; Koehn *et al.*, 2005).

Las enzimas mononucleares con Fe^{II} no hémico 2H-1C son diversas en cuanto a las reacciones que pueden catalizar y se han agrupado en cinco familias de acuerdo a sus requerimientos catalíticos (Solomon *et al.*, 2000; Ryle and Hausinger, 2002; Koehn *et al.*, 2005; Kovaleva and Lipscomb, 2008) (Fig. 3):

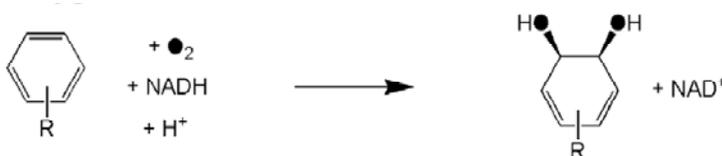
1. Las dioxigenasas de estradiol rompen el anillo aromático de catecol en el enlace C-C adyacente al grupo enediol por una oxidación de cuatro electrones incorporando ambos átomos de oxígeno molecular en el producto.
2. Las dioxigenasas Rieske catalizan la dihidroxilación en *cis* del doble enlace areno con NADH como donador de dos electrones. Ambos átomos de oxígeno son incorporados en el sustrato formando un producto *cis*-diol.
3. Las enzimas dependientes de α -cetoglutarato son un grupo muy versátil de enzimas que requieren un 2-oxoácido como fuente complementaria de electrones que durante la reacción sufre una decarboxilación oxidativa (típicamente el α -cetoglutarato). Los equivalentes oxidantes producidos pueden ser usados para efectuar una hidroxilación C-H, una transferencia oxígeno-átomo, la formación de un anillo heterocíclico o reacciones de desaturación.
4. Hidroxilasas de aminoácidos aromáticos que utilizan el co-factor tetrahidrobiopterina (BH_4) como fuente de electrones para hidroxilar el anillo aromático de los residuos de aminoácidos; estas enzimas son responsables del paso limitante durante la formación de serotonina y catecolamina.

5. El último grupo representa una categoría "incluyente" de la cual forman parte la isopenicilina N sintasa (IPNS), la oxidasa de ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACCO) y la fosfomicina epoxidasa.

Dioxigenasas de estradiol que rompen catecol



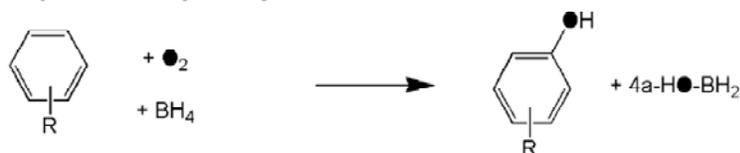
Dioxigenasas Rieske



Enzimas dependientes de α -cetoglutarato



Hidroxilasas dependientes de pterina



Otras oxidasas

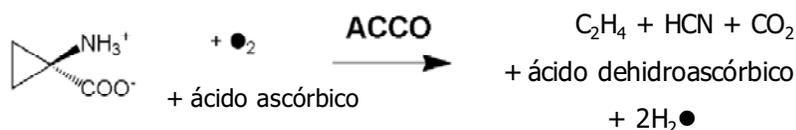
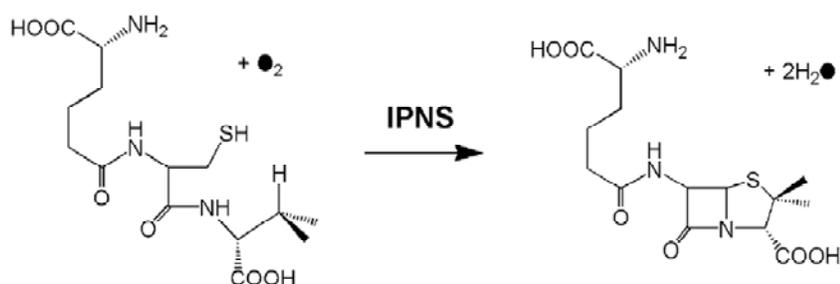


Fig. 3. Reacciones catalizadas por las cinco familias de enzimas mononucleares con Fe^{II} no hémico 2H-1C (modificado de Koehntop, *et.al.* 2005)

A pesar de que las enzimas con hierro no hémico catalizan un rango de reacciones tan amplio como aquellas que poseen el grupo hemo, sus mecanismos no se encuentran tan bien elucidados como los de las enzimas hémicas. La mayoría de las enzimas con hierro no hémico tiene como uno de sus sustratos al oxígeno molecular. Como se mencionó anteriormente la reacción no catalizada de compuestos orgánicos con el oxígeno es termodinámicamente favorable pero cinéticamente muy lenta debido a que existe una restricción en el espín y ya que el potencial de reducción con un solo electrón para el oxígeno es bajo (Sawyer, 1991; Solomon *et al.*, 2000). La mayoría de las metaloproteínas, y en especial las enzimas mononucleares de hierro no hémico en las que la reacción es catalizada por un hierro de alto espín, la superación de la barrera impuesta en las reacciones que involucran oxígeno molecular se lleva a cabo mediante (i) la activación del oxígeno a través de la reducción del sitio metálico y la generación de un intermediario peróxido (reducción de dos electrones), o (ii) la activación de los sustratos por un centro metálico oxidado que induce la formación de un radical (Holm *et al.*, 1996; Solomon *et al.*, 2000).

Un ejemplo de la activación del sustrato son las intradiol dioxigenasas y las lipoxigenasas, las que para activar al sustrato utilizan un sitio Fe^{III} de alto espín. La unión del sustrato conduce a la reducción del centro metálico y a la formación de un radical en el sustrato. El radical reacciona rápidamente con el oxígeno generando un sustrato-peroxi con un radical. El sustrato debe de ser activado por un ataque directo del oxígeno, generando un intermediario sustrato-peroxi que se convertirá en producto (Holm *et al.*, 1996; Pau *et al.*, 2007; Kovaleva and Lipscomb, 2008) (Fig. 4).

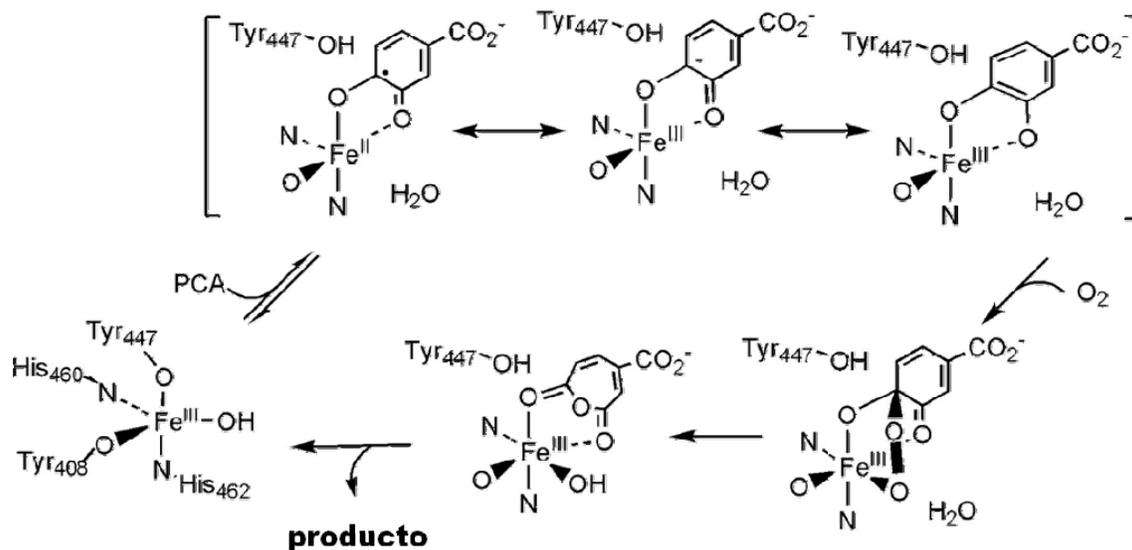


Fig. 4. Mecanismo catalítico de las intradiol dioxigenasas (Pau, *et al.* 2007)

Durante la activación del oxígeno molecular, la reducción de dos electrones de oxígeno hasta peróxido se puede alcanzar de dos formas: teniendo más de un sitio metálico reducido o en las enzimas mononucleares teniendo un donador de electrones exógeno. El ambiente de ligantes típico de los sitios de hierro no hémico es incapaz de generar un ambiente de estabilización de elevado estado de oxidación, pero si una especie hidroperoxi-férrica de bajo espín que es capaz de reaccionar de forma directa para abstraer un átomo de hidrógeno. De esta forma se genera un intermediario $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$ ($S=1$) que es reactivo a una segunda abstracción de un átomo de hidrógeno (las enzimas de hierro no hémico con intermediarios de alto espín generalmente obtienen dos electrones de un cofactor, resultando en la formación de un intermediario $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$ ($S=2$) que es similar en reactividad para la abstracción de un hidrógeno). El intermediario peroxi es la forma más reactiva de la enzima (Holm *et al.*, 1996; Decker and Solomon, 2005).

A pesar de su diverso rango de reacciones, es posible delinear mecanismos comunes a la catálisis de todos los miembros de la familia de enzimas con hierro no hémico (Fig. 5).

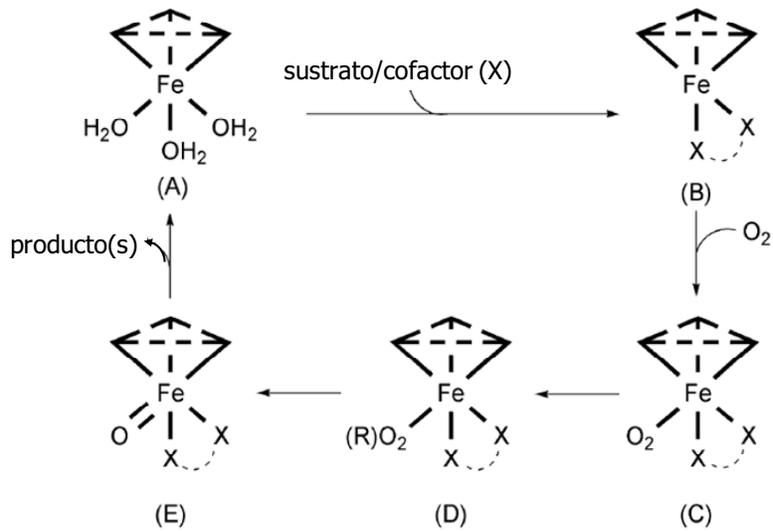


Fig. 5. Mecanismo general para las reacciones catalizadas por la familia de proteínas con motivo estructural 2H-1C (Bruijninx, *et al.* 2008)

En primer lugar, observamos el estado basal de la enzima estable en presencia de oxígeno molecular (A). La posterior unión del sustrato o cofactor resulta en la formación de un centro metálico penta-coordinado no saturado, que incrementa la afinidad del centro por el oxígeno (B). La reactividad del centro metálico subordinada a la unión del sustrato es un mecanismo de protección contra la desactivación suicida. En el siguiente paso el oxígeno molecular se activa de forma directa por la unión al centro metálico (C). Las enzimas utilizan dos formas para esta activación, ya sea mediante un cofactor redox activo o un sustrato redox activo que permite obtener los equivalentes necesarios para alcanzar el potencial redox para la reducción de un electrón necesario para activar el oxígeno. El oxígeno es reducido a peróxido (D) y a partir de este punto los mecanismos propuestos suelen divergir. En la mayoría de los casos se invoca la ruptura del enlace O-O y la formación de una especie oxo-ferril (E). Independientemente de su naturaleza, la especie catalítica parece ser la oxo-ferril (Fe^{IV} o Fe^{V}), sin embargo su asignación es aún contradictoria (Bruijninx *et al.*, 2008).

4.1.1 La ACCO

La ACCO (EC 1.14.17.4) es la última enzima en la vía de síntesis de etileno en plantas. El etileno se forma a partir de S-adenosil-L-metionina (AdoMet) que es transformado por la enzima ACC sintasa en el aminoácido (no proteico) ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico

(ACC) el cual después será transformado por la reacción enzimática de la ACCO en etileno(Adams and Yang, 1979;Bleecker and Kende, 2000;Soares A.L. and Mello-Farias P.C., 2006). El etileno actúa como fitoregulador y es producido en la mayoría de los tejidos de las plantas. Éste puede disparar la senescencia, influenciar el crecimiento y actuar durante condiciones de estrés biótico o abiótico, aparte de exhibir diferentes efectos morfogénicos (Soares A.L. and Mello-Farias P.C., 2006). Durante el proceso de senescencia, el etileno induce la maduración de frutos climatéricos (manzanas, bananas, melones y jitomates, entre otros), efecto que ha sido extensamente estudiado debido a su importancia agronómica (Bleecker and Kende, 2000). La maduración de frutos incluye una secuencia de eventos bioquímicos entre los que sobresalen la pérdida de la clorofila, la formación de pigmentos, sabores y aromas, el suavizado de la pulpa y eventualmente el desprendimiento de la planta. Pruebas de microarreglos permiten asociar la producción de etileno a la expresión de aproximadamente 214 genes en *Arabidopsis thaliana* que codifican principalmente para proteínas asociadas a metabolismo, defensa y transporte (Bleecker and Kende, 2000;Wang *et al.*, 2002;Chen *et al.*, 2005;Etheridge *et al.*, 2005;Soares A.L. and Mello-Farias P.C., 2006).

Desde el descubrimiento en 1979 del papel directo de la ACCO como la enzima responsable de la formación de etileno, el progreso en el esclarecimiento del mecanismo catalítico ha sido lento, debido en gran parte al complicado proceso de ensayos *in vitro* y a la falta de enzimas puras. En general, nuestro entendimiento de los mecanismos cinéticos y catalíticos es pobre (Brunhuber *et al.*, 2000).

La ACCO comparte el mismo plegamiento que la mayoría de las proteínas del grupo de oxigenasas no hémicas mononucleares dependientes de Fe^{II} caracterizadas por un motivo de 2H-1C, aunque difiere en el mecanismo de reacción, ya que no utiliza 2-oxoglutarato (2-OG) como co-sustrato sino que utiliza ácido ascórbico (AA)(Prescott and John, 1996;Zhang *et al.*, 2004). La secuencia proteica de diferentes ACCO se encuentra altamente conservada, siendo el extremo carboxilo terminal la región más variable. En particular, se han identificado dos histidinas (H177, H234) y un ácido aspártico (D179) que conforman el sitio activo característico de las enzimas con hierro no hémico 2H-1C, al coordinar al átomo de Fe (Zhang *et al.*, 2004;Bassan *et al.*, 2006) (Fig. 6).

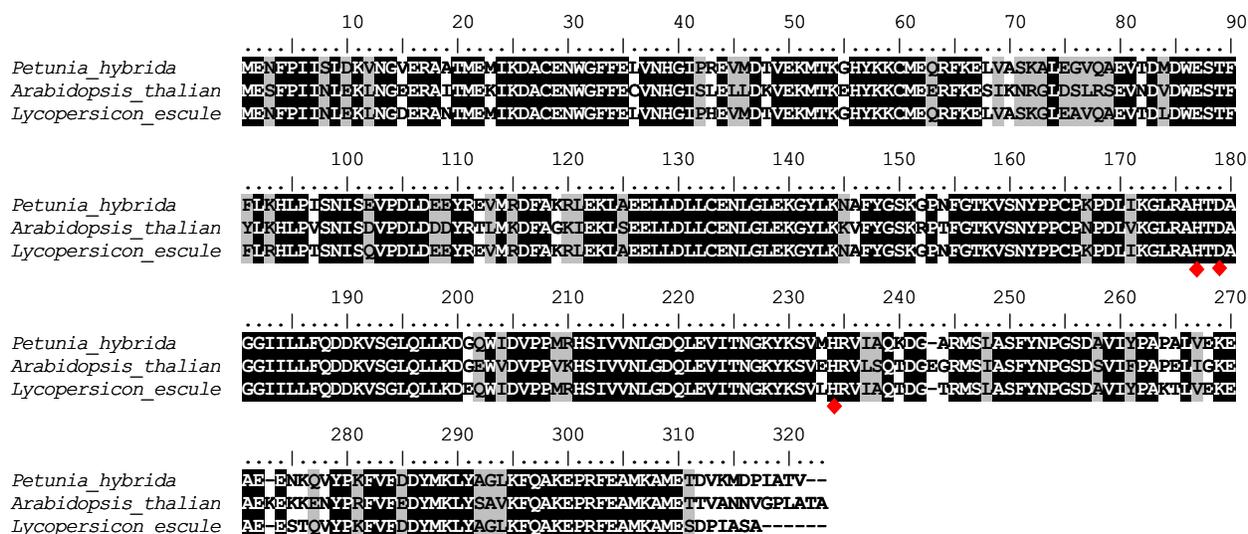


Fig. 6. Comparación de secuencias de la ACCO de interés con las ACCO's mejor caracterizadas. Los rombos marcan los residuos que coordinan al Fe.

4.1.2 Disección del mecanismo catalítico

No obstante los diferentes estudios realizados a la ACCO y las múltiples observaciones del mecanismo catalítico; hoy en día no se conoce el mecanismo generalizado de entrada de sustratos. Se tienen evidencias experimentales que apoyan por un lado un mecanismo secuencial y por otro a una entrada azarosa de sustratos (bu-Omar *et al.*, 2005). Un primer modelo que surge a partir de cinéticas de estado estacionario y del estudio con inhibidores sugiere un mecanismo de unión al azar en donde el ACC o el ácido ascórbico pueden unirse en primer lugar, seguidos del oxígeno y la especie restante (ácido ascórbico o ACC) en tercer término (Thrower *et al.*, 2001). En este caso parece ser que el ácido ascórbico en general es el primer sustrato en unirse. Alternativamente, el mecanismo de unión ordenado se basa en cinéticas de estado estacionario estudios de EPR y ENDOR en aductos de la parte nitrosilo del ACC. Este mecanismo propone que el ACC se une primero coordinando el hierro de una forma bidentada mediante la unión de los grupos α -amino y α -carboxilo. Los estudios espectroscópicos interpretan el siguiente paso como la unión del oxígeno gracias a una disminución en el potencial redox como consecuencia de la coordinación del ACC al centro metálico (bu-Omar *et al.*, 2005). Sin embargo, no es fácil discriminar si el punto de entrada del ácido ascórbico es anterior a la unión del ACC o posterior a la unión al oxígeno molecular (Rocklin *et al.*, 2004).

A continuación se describe el mecanismo catalítico, intentando hacer un consenso de las diferentes fuentes y evidencias que se encuentran en la literatura; cabe repetir que este mecanismo catalítico no se encuentra perfectamente elucidado. En general la catálisis de la ACCO puede describirse como la activación del ACC mediante la oxidación de un electrón o la abstracción de un átomo de hidrógeno desde el grupo amino para dar lugar a la formación de un catión radical amino o radical aminilo. El reacomodo rápido de radicales resulta en la ruptura del anillo de ciclopropano y la eventual formación de etileno, CN^- y CO_2 (Fig. 7) (Mirica *et al.*, 2008; Mirica and Klinman, 2008).

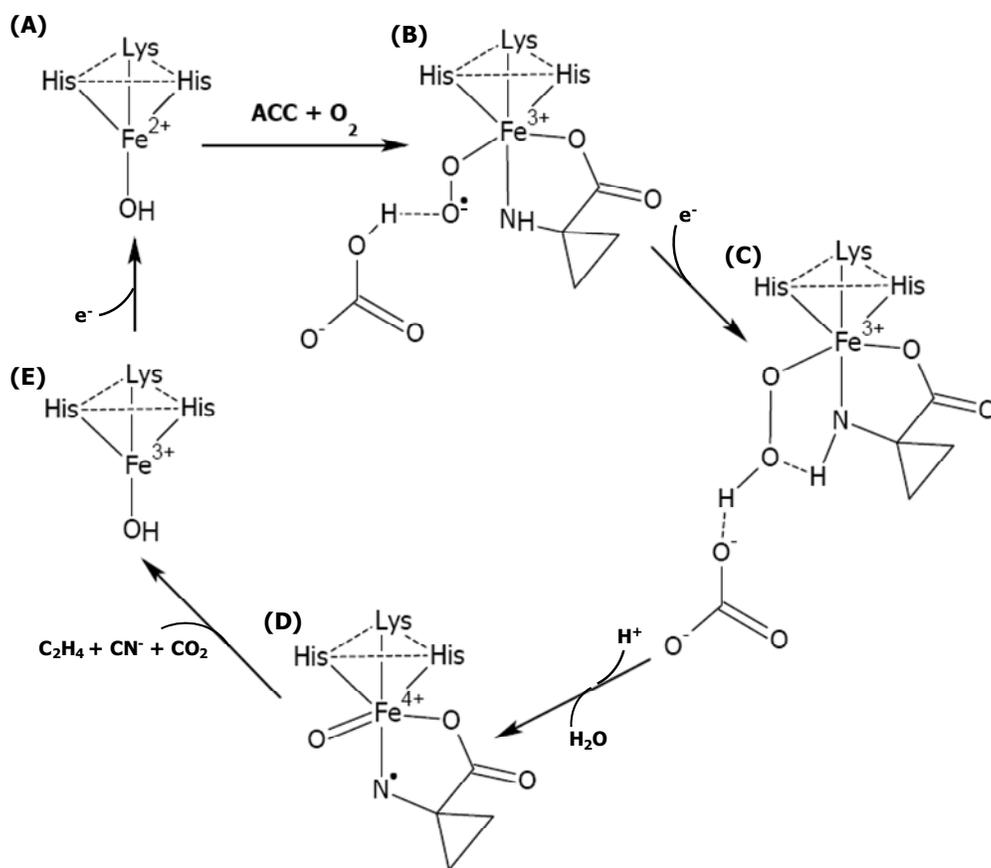


Fig. 7. Mecanismo catalítico propuesto para la ACCO

En el estado basal el metal se encuentra tetra-coordinado como Fe^{II} (A). La unión de ACC al Fe^{II} disminuye el potencial redox del intermediario penta-coordinado permitiendo la unión del oxígeno como sexto ligante. Los electrones de este nuevo compuesto se redistribuyen

generando un radical libre peroxil ferril ($\text{Fe}^{\text{III}}\text{-O}_2^{\bullet}$). Una molécula de bicarbonato (HCO_3^-) se posiciona en la vecindad del complejo estabilizando al radical peroxilo, sin embargo, esta especie no es lo suficientemente reactiva para oxidar el ACC (B).

En un paso subsecuente, el radical peroxilo se rescata como consecuencia de la donación de un electrón por un reductor externo, dando lugar a un intermediario inestable formado por una especie $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-OOH}$ (C). La transferencia de dos protones (uno del carbonato y otro del ACC) acelera la ruptura del enlace O-O, la salida de una molécula de agua y la formación de la especie catalítica oxo- Fe^{IV} (D). Durante la formación de este último compuesto se genera un radical aminilo (radical libre en el nitrógeno del ACC unido al Fe). Lipscomb, Que y colegas sugieren que la oxidación del ACC involucra la transferencia de un átomo de hidrógeno a un $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-OOH}$ o una previa heterólisis del enlace O-O para generar la especie $\text{Fe}^{\text{V}}=\text{O}$ como especies oxidantes (Rocklin *et al.*, 2004), sin embargo, Simaan hipotetiza esta situación solo en el caso de que la ruptura del oxígeno sea heterolítica (comunicación personal). En sus ejemplos, la especie $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$ debe formarse de manera concomitante con la activación del sustrato. Múltiples especies ($\text{Fe}^{\text{III}}\text{-OOH}$, $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$, o $\text{Fe}^{\text{V}}=\text{O}$) han sido postuladas como probables oxidantes dentro del mecanismo de reacción aunque no se cuenta con evidencias directas de la especie Fe^{V} , sin embargo se espera que esta dé lugar al intermediario Fe^{IV} si se encuentra en presencia de semi-dehidroascorbato (Mirica and Klinman, 2008).

La especie catalítica (D) sufre entonces una redistribución de electrones la cual promueve la ruptura del anillo ciclopropano del ACC y la liberación de etileno, CO_2 y un ión cianuro, dejando al metal como Fe^{III} tetra-coordinado (E). Para restaurar el estado basal, indispensable para continuar con el recambio enzimático, se utiliza un segundo electrón y se piensa que ésta es una de las funciones del ácido ascórbico como co-sustrato (Rocklin *et al.*, 2004; Bassan *et al.*, 2006).

Dong *et al.* establecen la estequiometría de la reacción como la producción equimolar de etileno, dehidroascorbato, CN^- y CO_2 por cada mol consumido de ACC y de oxígeno (Dong *et al.*, 1992). De igual manera, se ha demostrado que la ACCO es capaz de catalizar la formación de etileno en ausencia de ácido ascórbico, pero con una velocidad inicial dos órdenes de magnitud menor que cuando se encuentra en exceso (Rocklin *et al.*, 2004).

4.1.3 Inconsistencias del mecanismo catalítico

Como se mencionó anteriormente existen evidencias que pueden sustentar mecanismos alternativos. El mecanismo de trabajo propuesto por Mirica *et al.*, basado en efecto cinético isotópico (KIE) y efecto de isótopo en el solvente (SIE) postula que aunque el evento de la unión del sustrato y el oxígeno se den de una manera ordenada, la interacción del ácido ascórbico con la enzima es al azar y dependiente de la concentración (Mirica and Klinman, 2008). En concentraciones de saturación de ácido ascórbico, se propone que esto compuesto se une en primer término, seguido del ACC y el oxígeno (Mirica *et al.*, 2008). Para tal mecanismo cinético, el paso limitante de la reacción sería la formación de la especie $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$ en un proceso que involucra la transferencia de un electrón acoplada a un protón. La oxidación de la especie $\text{Fe}^{\text{III}}-\text{O}_2^{\bullet}$ a la especie $\text{Fe}^{\text{III}}-\text{OOH}$ es posiblemente reversible. Cuando la concentración del ácido ascórbico se encuentra por debajo del valor de su K_M , se propone se une en último término, subsecuente al oxígeno con esta unión como limitante. A diferencia del sustrato coordinado directamente al hierro, la unión del ácido ascórbico al sitio activo de la ACCO no es indispensable para la conversión del centro metálico de una coordinación hexa a penta y la reducción inicial del O_2 para formar la especie $\text{Fe}^{\text{III}}-\text{O}_2^{\bullet}$ (Mirica *et al.*, 2008; Mirica and Klinman, 2008). Es pertinente mencionar que ambos mecanismos convergen en la entrada del oxígeno en un paso intermedio de tal forma que se permite limitar la formación de especies oxidantes hasta que el sustrato se encuentra presente, reduciendo el daño potencial a la enzima por la formación de ROS previo a la unión con oxígeno (Thrower *et al.*, 2001; bu-Omar *et al.*, 2005).

Otro aspecto del mecanismo catalítico que ha generado controversia es el papel del CO_2 o bicarbonato como co-factor de la catálisis, sin tener claro cuál de las dos formas es la que se utiliza durante la reacción, su localización o sitio de unión. Diferentes autores argumentan que la utilización de CO_2 es preferencial al observar un incremento en la V_{max} y la K_M aparente cuando la concentración de CO_2 se eleva en el rango de 5 a 20% en comparación con con la utilización de bicarbonato (Zhou *et al.*, 2002). De igual manera se conoce que el bicarbonato actúa como activador ya que estimula la catálisis de manera independiente a las propiedades redox, incrementa la k_{cat} y protege a la ACCO de desactivación. También se sabe que en presencia del bicarbonato el ACC se une al hierro de manera bidentada (Fernandez-Maculet *et al.*, 1993). Otras propuestas involucran al bicarbonato en la formación de especies reactivas por procesos de protonación específicos, en particular Rocklin *et al.* proponen que el bicarbonato se une a una Ser y Arg conservadas cerca del sitio activo dentro del motivo estructural DSBH

(Rocklin *et al.*, 2004;bu-Omar *et al.*, 2005;Bruijninx *et al.*, 2008). Estudios de espectroscopía cercana al infra-rojo, dicroísmo circular y dicroísmo circular magnético dan evidencia de que en presencia de CO₂ se observa una geometría de cinco coordinaciones piramidal cuadrada distorsionada cuando el ACC y el ácido ascórbico se encuentran unidos al hierro (Zhou *et al.*, 2002). Al CO₂ también se le adjudica un papel estabilizador complementario en la geometría octaédrica distorsionada del complejo ACCO/Fe^{II}/ACC. En ausencia de CO₂ aproximadamente el 30% del complejo octaédrico se transforma a una geometría piramidal cuadrada en donde solamente el ACC se encuentra coordinando el complejo y que se asocia a desactivación de la enzima por una posible vía de daño oxidante (Prescott and John, 1996).

Tradicionalmente se ha incorporado bicarbonato en la mezcla de reacción para monitorear la actividad de la ACCO; la utilización diferencial de bicarbonato o CO₂ no ha sido resuelta aún. La implicación de que el CO₂ sea el co-factor o activador y no el bicarbonato trae como consecuencia que las condiciones de ensayos previos a esta observación hayan sido hechas bajo condiciones sub-óptimas. Esta observación deja clara la necesidad de hacer una revisión del mecanismo antes propuesto.

De igual manera el papel del ácido ascórbico permanece sin ser resuelto. Thrower *et al.* propone que el ácido ascórbico se une en un sitio lejano al hierro, en los residuos del sitio activo R224 y S246 (ACCO del jitomate) (Thrower *et al.*, 2001). Al ácido ascórbico se le clasifica tanto como un co-sustrato (Zhou *et al.*, 2002) favoreciendo la formación del complejo enzima-sustrato-dioxígeno (Rocklin *et al.*, 2004;Bruijninx *et al.*, 2008). También se llegó a sugerir un papel como regulador de la unión de las moléculas al hierro limitando el acceso a moléculas pequeñas. El ácido ascórbico no es indispensable en condiciones de recambio sencillo siempre y cuando el bicarbonato se encuentre presente (Rocklin *et al.*, 2004). Sin embargo, el ácido ascórbico incrementa de manera dramática la producción de etileno y la oxidación del hierro (Buettner and Jurkiewicz, 1996;Rocklin *et al.*, 2004;bu-Omar *et al.*, 2005).

Los estudios cinéticos de Thrower *et al.* no reportan cambios considerables en la k_{cat} observada al utilizar diferentes análogos de ACC cíclicos y acíclicos (Thrower *et al.*, 2006). Estos resultados predicen un paso determinante de la reacción precedente a la activación del sustrato y la especie de valencia elevada Fe^{IV}=O como responsable de la química subsecuente. Estos datos se confirman de cierta manera con los resultados obtenidos mediante KIE y SIE por Mirica *et al.*, siendo la única variante la concentración de ácido ascórbico (Mirica and Klinman, 2008). El electrón necesario para la reducción del enlace peroxilo proviene de un radical semi-

dehidroascórbico por un mecanismo de esfera externa. Este mecanismo difiere de aquel propuesto por Rocklin *et al.*, cuyos estudios de cinética transitoria muestran la producción de etileno durante un ciclo sencillo de recambio catalítico sin la presencia de ácido ascórbico (Rocklin *et al.*, 2004). En este último caso, se propone que el sustrato provee los electrones para la reducción del oxígeno con la reducción del centro metálico al final del ciclo. El mecanismo general se muestra en la figura 7, mientras que el mecanismo alternativo se esquematiza en la figura 8.

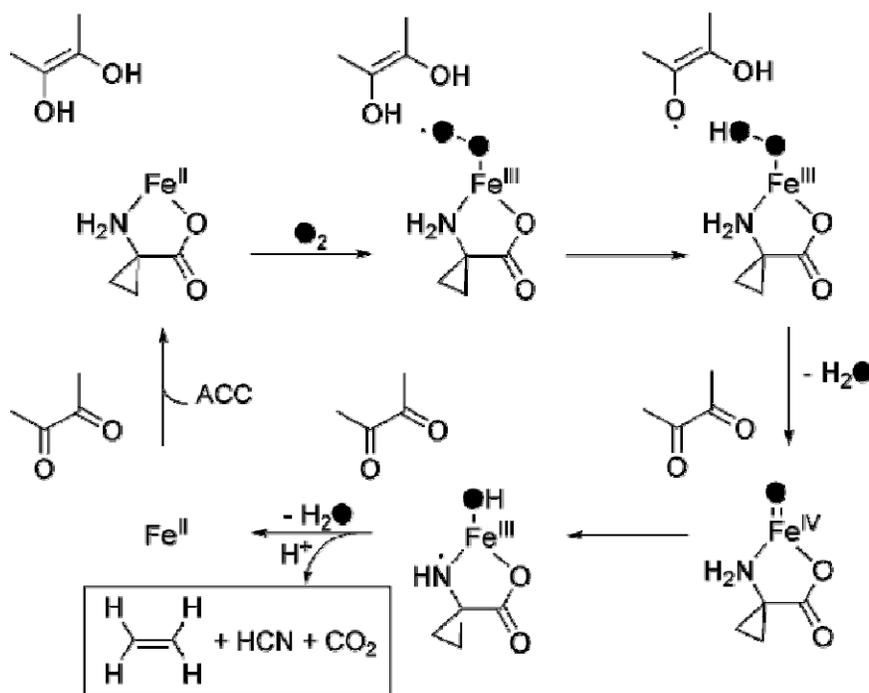


Fig. 8. Mecanismo catalítico propuesto por Thrower (Bruijninx, *et al.* 2008).

La secuencia y fuente de los electrones donados al oxígeno así como su activación aún permanecen como una incógnita dentro del estudio del mecanismo de de la ACCO, debido a que tanto el sustrato como el ácido ascórbico pueden actuar como donadores simples de electrones. Sin embargo, se propone que la donación de un primer electrón (sin importar la fuente) tiene como consecuencia la formación de la especie $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-OOH}$, de igual manera la ruptura del enlace O-O conduce a la formación de la especie $\text{Fe}^{\text{IV}}\text{=O}$ (Bruijninx *et al.*, 2008).

4.1.4 Del mecanismo de desactivación

Miles de años de evolución han generado una batería de formas de regulación en los seres vivos, cada sistema posee diferentes formas de auto-regularse y ser económico, la estabilidad de una proteína fuera de ese contexto parecería no hacer sentido especialmente si buscamos una aplicación biotecnológica. Algunas de las enzimas encontradas en la naturaleza poseen una estabilidad notable, mientras que en los otros extremos encontramos enzimas que parecen realmente lábiles. En el caso de la ACCO, existen abundantes reportes que indican que es una oxidasa particularmente lábil bajo condiciones de recambio catalítico con una vida media que va en un rango de 15 a 25 min para la enzima de jitomate dependiendo de las condiciones de reacción hasta 2h para la enzima de manzana, siempre con una cinética de desactivación de primer orden (Fig. 9). Se ha reportado previamente que la desactivación de la ACCO no es un efecto de inhibición por producto, ya sea dehidroascorbato o cianuro, ocurriendo siempre la máxima desactivación bajo condiciones catalíticas. En esta figura vemos el decaimiento de la actividad en condiciones catalíticas, así como el efecto protector de sus co-sustratos.

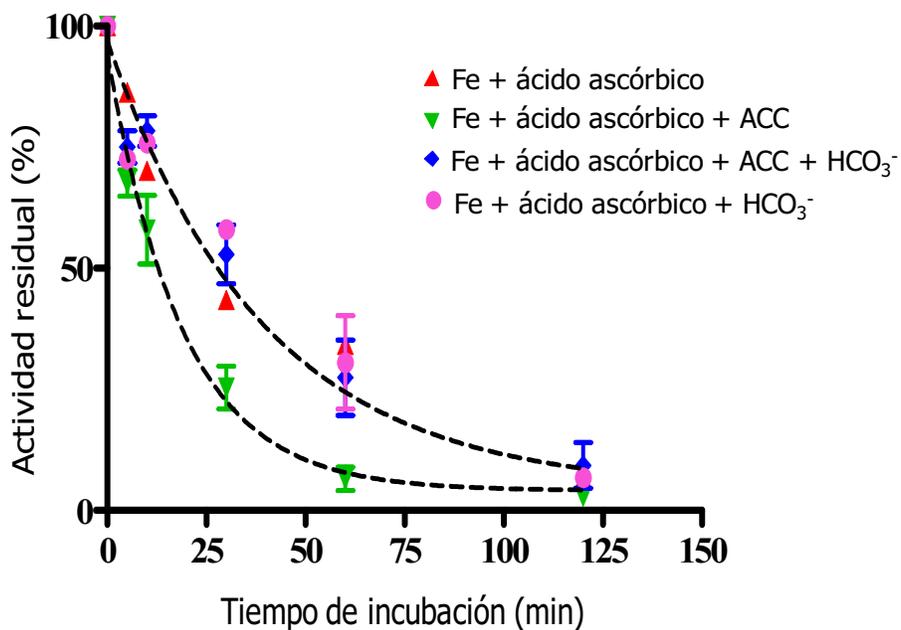


Fig. 9. Cinética de desactivación de la ACCO de jitomate (El Bakkali y Simaan, comunicación personal)

Existen pocos modelos que pretendan explicar la desactivación de la ACCO. El fenómeno de la desactivación se observa cuando la ACCO es pre-incubada con ACC, hierro y ácido ascórbico, es decir, en condiciones catalíticas. Este tipo de desactivación se relaciona con el recambio catalítico debido, a que la omisión de al menos uno de los reactivos protege de este tipo de desactivación. Un segundo tipo de desactivación se reporta cuando la ACCO se incubaba

con ácido ascórbico en ausencia de ACC y en presencia de Fe^{2+} . Este segundo fenómeno de desactivación puede prevenirse al añadir catalasa al medio, y es atribuida a la formación de peróxido de hidrógeno generado por la oxidación del ácido ascórbico en presencia de oxígeno. Si tomamos en cuenta el mecanismo para la oxidación del ácido ascórbico ($AA + O_2 \rightarrow AA^{\bullet-} + O_2^{\bullet-}$) (Scarpa *et al.*, 1983), podemos concluir que el peróxido de hidrogeno no es uno de los productos que se puedan encontrar en la reacción.

El ácido ascórbico posee un efecto cruzado ya que puede actuar como pro-oxidante o anti-oxidante dependiendo de su concentración. Este efecto cruzado puede es debido a que en presencia de ácido ascórbico, los metales catalíticos pueden iniciar cadenas de radicales libres para la oxidación. Debido a la química antioxidante del ácido ascórbico, en condiciones elevadas, los eslabones en los pasos en la cadena de oxidación son temporalmente cortos, haciendo que el daño existente sea pequeño. A medida que la concentración de ácido ascórbico se reduce, los pasos en la cadena se vuelven más lentos y así el daño ocasionado es temporalmente mayor. Si la concentración de ácido ascórbico es baja, la reacción de oxidación puede llegar a la enzima (pocos eslabones en la cadena de oxidación); en concentraciones altas la cadena de oxidación es mayor y esto previene el efecto sobre la enzima, es decir retrasa la llegada del evento oxidante a la cadena polipeptídica (Carr and Frei, 1999).

El modelo de desactivación de la ACCO más documentado se basa en la observación de proteólisis concurrente con la desactivación en condiciones aerobias y en presencia de hierro y ácido ascórbico (carril 1 y 2 de la figura 10). La fragmentación aparentemente es completa después de cinco minutos, con un estimado de fragmentación menor al 10%. Si se adiciona peróxido de hidrogeno al 0.1% (v/v) el porcentaje de fragmentación no aumenta pero se altera la intensidad de algunas bandas (el análisis con un porcentaje mayor de peróxido de hidrogeno hace difícil el análisis debido a la aparición de bandas difusas en el gel denaturalizante). La inclusión de BSA o catalasa no altera los patrones de fragmentación ni su porcentaje. Los niveles de fragmentación parecen ser dependientes de la concentración de ácido ascórbico utilizado cuando se modifica la relación hierro/ácido ascórbico de 0.04 mM/25 mM a 0.4 mM/2.5 mM. La presencia del sustrato (ACC) en el medio genera un patrón de bandas diferentes (carril 3 de la figura 10) comparando con los carriles en donde se encuentra ausente. La secuenciación de las bandas obtenidas durante los experimentos de fragmentación permitió la determinación de un sitio proteolítico entre la Leu-186 y la Phe-187 (para la secuencia de ACCO de jitomate), encontrándose dentro del sitio activo.

Dado que la fracción de la enzima que se fragmenta (aprox. 10%) es proporcionalmente menor que la pérdida de actividad observable a los cinco minutos en que se reporta que la fragmentación como completa, es posible que exista más de una causa de la desactivación. Para reforzar esta interpretación, cuando se efectúa la reacción bajo condiciones de recambio sencillo (un solo ciclo catalítico) se observa desactivación pero no proteólisis. Lo que se mantiene como una observación constante es que la desactivación de la ACCO es irreversible y general para todas las ACCO estudiadas, independientemente de la fuente.

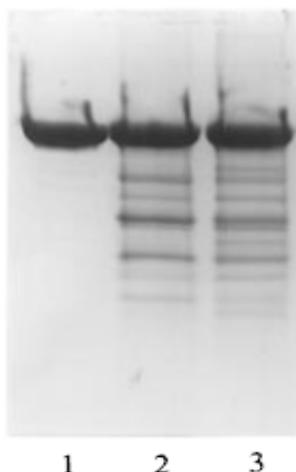


Fig. 10. Fragmentación de la ACCO después de 5 minutos de incubación.
Carril 1 sin tratamiento,
Carril 2 ACCO/Fe/ácido ascórbico,
Carril 3 ACCO/Fe/ácido ascórbico/ACC
Adaptado de (Barlow *et al.*,1997).

Los ensayos con la ACC oxidasa son complejos debido a la gran cantidad de sustratos involucrados, la interferencia de procesos no enzimáticos en la mezcla de reacción, la labilidad de la proteína y su activación por un gas, así como la necesidad de muestrear un producto gaseoso. Estas características únicas la hacen un modelo difícil de comprender. Hay que tener en cuenta que los modelos vigentes tanto para la catálisis como para la desactivación omiten considerar a los componentes de la proteína como donadores de electrones, es decir, le asignan un papel pasivo a pesar de que se sabe que los aminoácidos son buenos donadores de electrones. Cabe resaltar que dentro de los aminoácidos identificados por Barlow *et. al.* como

sitios de proteólisis durante la desactivación de la ACCO de jitomate participan aminoácidos que se han reportado susceptibles a daño oxidante.

5. Expresión y purificación de la ACCO

Para la identificación de la ACCO fueron necesarias metodologías diferentes a los métodos bioquímicos convencionales, la identificación de la ACCO fue posible gracias a la expresión de una clona de cDNA que correlacionó con patrones alterados en la maduración de frutos (Abeles *et al.*, 1992). Como se mencionó, la obtención de la ACCO presento grandes retos debido a su baja estabilidad y la necesidad de utilizar métodos no convencionales, entre los que caben destacar una serie de obtenciones parciales incluyendo la extracción de isoformas bajo una atmosfera de N₂ (Kende, 1993). Himilton *et al.* 1991 lograron identificar la secuencia de nucleótidos del gen responsable de la síntesis de la ACCO en jitomate (Hamilton *et al.*, 1991). Posteriormente Zhang *et al.* 1995 clonan la secuencia de proveniente del cDNA de jitomate (pTOM13) en el plásmido pZAT6, dicha construcción se utilizó posteriormente para transformar células de *E. coli* BL21(DE3)pLysE (Zhang *et al.*, 1995). Utilizando ésta recombinante fue posible expresar la ACCO de jitomate y recuperarla mayoritariamente en la fracción soluble, así mismo, se estableció un protocolo de purificación con el cual se obtuvo una preparación cercana a homogeneidad con un 95% de pureza, aunque es posible recuperar tan solo un 43% de actividad (Zhang *et al.*, 1995). Existen diversos reportes de expresión heteróloga de ACC Oxidasas provenientes de diferentes fuentes naturales, entre las que resaltan la expresión de la ACCO de *Petunia hybrida* (Zhang *et al.*, 2004), Manzana (Shaw *et al.*, 1996), Kiwi (Lay *et al.*, 1996; Chuan Xu *et al.*, 1998) y aguacate (Brunhuber *et al.*, 2000). La obtención de estas recombinantes sigue una metodología similar a la que reportan por primera vez Zhang *et al.* expresando la secuencia silvestre del gen en *E. coli*, es decir, la secuencia nucleotídica tal como se obtiene del cDNA del organismo de origen (Zhang *et al.*, 1995). La elección del hospedero para la expresión de la ACCO parece no presentar un reto, la expresión de ACCO de fuentes diversas apuntan a que la maquinaria de transcripción y traducción de *E. coli* es lo suficientemente adecuada para la obtención de la recombinante.

A pesar de que *A. thaliana* es el modelo por elección para estudios en sistemas vegetales debido al profundo conocimiento que se viene generando desde la época de 1980 (Meyerowitz, 2001) hasta donde tenemos conocimiento la utilización de una ACCO

recombinante de este organismo no ha sido reportada en la literatura. *A. thaliana* organismo juega un papel clave en el entendimiento de los componentes bioquímicos en el sistema de transducción de las señales producidas por el etileno; producto principal de la reacción de la ACCO debido al amplio conocimiento y facilidad de manipulación de sus genes (Bleecker and Kende, 2000). Evolutivamente las llamadas plantas superiores dentro de las cuales se encuentra *A. thaliana* sintetizan etileno mediante la ACCO, para *A. thaliana* el TAIR (The *Arabidopsis* Information Resource) reporta al menos seis anotaciones de secuencias con evidencia de actividad de ACCO mientras que en el NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) es posible encontrar al menos diez anotaciones que presentan homología con otras ACCO reportadas.

De la purificación de la ACCO el primer reporte de la obtención de una preparación cercana a homogeneidad la hacen Dong *et al.* al reportar purificación de la ACCO de manzana desde su fuente natural, la purificación según se reporta consta de tres pasos cromatográficos un primer paso por un intercambiador aniónico débil, seguido de interacción hidrofóbica y un paso de refinamiento mediante exclusión molecular (Dong *et al.*, 1992). Zhang *et al.* establece un protocolo de purificación utilizando la recombinante de jitomate que consta de tres pasos cromatográficos, este protocolo es muy similar en principio al que se utiliza para obtener la ACCO de manzana, diferenciándose en la utilización de dos intercambiadores aniónicos en los primeros pasos y sin la utilización de un paso de interacción hidrofóbica (Zhang *et al.*, 1995). Los protocolos establecidos posteriormente se basan en la utilización de intercambiadores aniónicos débiles y un paso de refinamiento por exclusión molecular.

No obstante los esfuerzos que se han hecho en la expresión y purificación de diferentes ACC oxidasas, los grupos principales de trabajo concentran su esfuerzo en la caracterización de las ACCO de jitomate y aguacate. Los reportes de la purificación y medición de actividad en ambos casos parecen estar estandarizados, lo cual debería de asegurar su reproducibilidad bajo condiciones similares de trabajo, sin embargo suelen presentarse dificultades en cada uno de los casos particulares haciendo difícil su reproducibilidad (El Bakkali y Simaan, comunicación personal). Contender con una baja reproducibilidad en la expresión, purificación y medición de la actividad de la ACCO es uno de los retos al trabajar con ésta enzima aunado a una desactivación en condiciones catalíticas y pobre comprensión del ciclo catalítico. Ahora, las ambigüedades en la descripción del ciclo catalítico podrían deberse a particularidades en las enzimas utilizadas para su elaboración, lo cual, en este caso en particular es un problema importante cuando se han utilizado tan solo dos isoformas para su elaboración. El estudio

detallado de la ACCO y una posible generalización de los mecanismos catalíticos y/o del mecanismo de desactivación implican la convergencia de un amplio rango de estudios que permitan discriminar particularidades de las isoformas.

Hipótesis

La obtención de una preparación estable de ACCO es posible si se tiene un adecuado sistema de expresión y si las condiciones de purificación favorecen la retención del centro metálico en el centro activo de la proteína garantizando su conformación nativa.

Objetivos

Identificar mediante métodos bioinformáticos un gen de de *A. thaliana* que codifique para una ACCO.

Clonar y expresar el producto del gen AT1G05010 de *A. thaliana* en *E. coli*.

Purificar la ACCO recombinante.

Articular diferentes metodologías para analizar la actividad enzimática.

Estimar la actividad enzimática.

Materiales y Métodos

Todos los reactivos usados fueron de calidad analítica y provinieron de Sigma-Aldrich, a reserva de que se indique lo contrario en el texto y a excepción del ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico que fue obtenido de Calbiochem. Todos los oligonucleótidos utilizados fueron sintetizados en la Unidad de Síntesis del Instituto de Biotecnología, UNAM.

1. Electroforésis

■ DNA. Los geles de agarosa (grado DNA) se prepararon al 1% (para fragmentos menores a 800 pares de bases) en amortiguador TAE.

TAE 50X.

242 g Tris base
57.1 mL ácido acético glacial
100 mL 0.5 M EDTA (pH 8.0)
Aforado a 1 L

■ Proteínas. Los geles de proteínas se prepararon con poliacrilamida al 12%.

	Gel (10 mL)	Pregel (4 mL)
Agua	3.3	2.7
Acrilamida 30%	4.0	0.66
Amortiguador Tris [*]	2.5	0.5
SDS 10%	0.1	0.04
Persulfato de amonio 10%	0.1	0.04
TEMED	0.004	0.004

^{*}El pH de este amortiguador es de 8.8 para el gel y 6.8 para el pregel.

2. Cepas y medios de cultivo.

Las cepas *E. coli* DH5a y *E. coli* Rosetta(DE3) (Novagen) se crecieron en medio LB (NaCl 171 mM, peptona 1%, y extracto de levadura 0.5%; para el medio sólido se adiciono agar al 1.5%) a temperaturas variables.

3. Purificación de DNA plasmídico.

Se inoculó una colonia aislada en 3 mL de medio LB con el antibiótico correspondiente y se incubó a 30° C por 16 h. posteriormente se cosechó el paquete celular por centrifugación y se purificó el plásmido por lisis alcalina con el estuche Wizard® Plus SV Minipreps (Promega). Después de la purificación la pastilla de DNA fue disuelta en 50 µL de H₂O tetradestilada y se almacenó a -20° C para su posterior utilización.

4. Análisis bio-informático de la ACCO

Para identificar las enzimas que comparten similitud con las ACCO previamente utilizadas en por otros grupos de estudio, se realizó una búsqueda en la base de datos del NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). Las secuencias de aminoácidos de la ACCO de *Solanum lycopersicum* y *Petunia x. hybrida* se utilizaron para realizar un alineamiento utilizando la aplicación BLAST en el servidor del NCBI.

5. Reacciones de amplificación.

Para la obtención de los fragmentos con la secuencia de la ACCO se realizó una reacción de amplificación en cadena. La secuencia de la ACCO se obtuvo de la clona Pda01189 (RIKEN Bio Resource Center (Seki *et al.*, 1998; Seki *et al.*, 2002)) que contiene la secuencia del gen AT1G05010 de *Arabidopsis thaliana*. El programa utilizado fue: 1 ciclo de desnaturalización (5 min. a 95°C), seguido de 30 ciclos de amplificación (30s a 95°C, 30s a 55°C, 60s a 72°C), y finalmente un ciclo de extensión (5 min. a 72°C).

Los oligonucleótidos utilizados fueron:

5'-AAATAAAC**CATATG**GAGAGTTTCCCGATCATCAATCTCGAG-3' para el extremo 5'

5'-AAATAAAG**GAATTC**TTATCACGCAGTGGCCAATGGTC-3' para el extremo 3'

En negritas se leen los sitios de restricción introducidos para NdeI y EcoRI respectivamente. Las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador PCR SPRINT (Termo). La mezcla de reacción consistió en: 5 ng de plásmido, 5 U de Taq-DNA polimerasa (Altaenzymes), 10 pmol de cada oligonucleótido, Buffer Taq 1x, MgCl₂ 2.5mM y 2.5 mM de dNTPs en un volumen final de 50 µL.

Para generar una proteína con una cola de histidinas se amplificó el gen de la ACCO con el oligonucleótido.

5'-AAATAA**GAATTC**GTCGCGAGTGGCCAATGGTC-3' para el extremo 3'

De igual manera el sitio de restricción introducido para EcoRI se encuentra resaltado en la secuencia con negritas. Este oligonucleótido se utilizó en combinación con el oligonucleótido para el extremo 5' que se describe arriba. Las condiciones de reacción fueron las mismas que en el caso anterior.

El producto final de las reacciones de amplificación se analizó en un gel de agarosa al 1%. El fragmento de la talla esperada que se obtuvo después de cada una de las amplificaciones se extrajo del gel de agarosa al 1% utilizando el estuche QiaQuick PCR purification Kit (Qiagen).

6. Construcción de los vectores.

Para la construcción del vector de propagación se utilizó el kit pGEM-T Easy Vector de PROMEGA adicionando en la reacción el fragmento amplificado de la ACCO previamente purificado de gel, generando el vector de propagación denominado pGEM-ACCO y pGEM-Ahis respectivamente mediante una reacción de ligación. De igual manera se construyó el vector de expresión pGEM-MEGR, con la diferencia que el fragmento utilizado para la ligación es una variante de la secuencia de la ACCO con uso de codones diferente (cuya construcción se describe posteriormente).

Para obtener el fragmento de la ACCO, ACCO-His y METIS derivados de los vectores de propagación, los plásmidos (pGEM-ACCO, pGEM-Ahis y pGEM-MEGR) fueron digeridos con las enzimas de restricción EcoRI y NdeI. Mismo tratamiento que recibió el plásmido de expresión pET-32a(+). Los fragmentos resultantes de las restricciones se extrajeron de gel utilizando el estuche QiaQuick PCR purification Kit (Qiagen).

El vector de expresión utilizado fue el plásmido pET-32a(+) (Novagen). La estrategia de clonación se diseñó de manera que la secuencia codificante de la ACCO se ligara entre los sitios NdeI y EcoRI, después del promotor T7 y antes del casete de resistencia a ampicilina. Los fragmentos codificantes de la ACCO se ligaron al vector utilizando la ligasa T4 DNAligasa (BioLabs) generando los vectores de expresión pET-A13, pET-Ahis13 y pMETIS.

La diferencia entre cada uno de los vectores radica en el fragmento utilizado para la inserción en el vector de expresión. La diferencia entre fragmentos es la fase de lectura en la que quedan al ser ligados (a excepción de la construcción pMETIS que difiere en mutaciones puntuales para poder cambiar el uso de codones). De igual manera los sitios de terminación de la traducción son diferentes, para la primera y tercera construcción (pET-A13 y pMETIS) existe un doble sitio de terminación el sitio de terminación silvestre seguido de un codón de terminación extra que se introdujo con el oligonucleótido para el extremo 3', mientras que en la segunda construcción (pET-Ahis13) para lograr la inserción de la cola de histidinas fue necesario remover el codón de término silvestre y dejar la secuencia en fase de lectura para que continuara hasta la segunda cola de histidinas codificada en el vector.

7. Cambio de uso de codones.

Para la obtención del fragmento de la ACCO con las mutaciones puntuales se realizó una serie de reacciones de amplificación. La secuencia de la ACCO se obtuvo de la clona Pda01189(Seki *et al.*, 1998;Seki *et al.*, 2002) (RIKEN Bio Resource Center) que contiene la secuencia del gen AT1G05010 de *Arabidopsis thaliana*.

Los oligonucleótidos utilizados fueron:

MutACO1 5'-ATAACATATGGAGAGTTTCCCGATCATCAATCTGGAGAAG-3'

MutACO2* 5'-TAGAGACGGGAAGGTGCTTCAGGTAGAAAAGTGG-3'

MutACO3 5'-ATATCTCCGATGTCCCTGATCTGGACGACG-3'

MutACO4 5'-CGTCGGTGTGGGCACGCAGACCCTTGAC-3'

MutACO5 5'-CCGGCGGCATCATCCTGCTGTTCCAAGGCG-3'

MegACO1 5'-CCAAAAGCTCCAGTGAAATCCC-3'

MegACO2 5'-CTCTAAACCCAGATTCTCGCAC-3'

MegACO3 5'-GTTGATCGCCAGATTAACGACG-3'

MegACO4 5'-GACAGCAGAGCACAGTTTCATGTAATC-3'

AC89Fwd 5'-AAGTTTCAGGCCAAGGAACCAAGGTTTG-3'

En subrayado se marcan los tripletes que fueron modificados de la secuencia original.

Antes de realizar la reacción para obtener el gen fue necesario purificar los oligonucleótidos para eliminar sub-productos de la reacción de síntesis de los mismos. La

purificación se realizó mediante un gel de poliacrilamida PAGE al 12%, 7M de urea, en buffer TBE.

Con los oligonucleótidos puros, se ensambló el gen siguiendo la metodología que se ilustra en la figura 11: La serie de oligonucleótidos MutACO se utilizó para levantar tres fragmentos llamados 1, 2 y 3 de 342, 239 y 425 pares de bases respectivamente. Una vez amplificados, estos fragmentos fueron purificados de banda para su posterior utilización. Los fragmentos 1 y 2 fueron ligados entre ellos utilizando la ligasa T4. La reacción de ligación se utilizó como templado para una segunda reacción de amplificación con los oligonucleótidos MutACO1 y MutACO4, el fragmento de talla esperada se purificó de banda y se utilizó para una ligación con el fragmento 3. De nuevo la reacción de ligación se utilizó para una tercera amplificación utilizando los oligonucleótidos MutACO1 y ACCOrev. El fragmento de talla esperada se ligo al pGEM-T Easy vector de Promega, se seleccionaron las clonas que dieron positivo y se analizaron mediante amplificación de colonia. Los plásmidos de aquellas colonias de las cuales se logró amplificar un producto del tamaño de la ACCO se mandaron secuenciar. La construcción con la secuencia deseada fue denominada pGEM-MegR12.

Utilizando el pGEM-MEGR12 se amplificaron dos nuevos fragmentos utilizando la técnica de megaprimers según Tyagi *et al.* (Tyagi *et al.*, 2004). Con los oligonucleótidos MutACO1, MegACO1 y MutACO2 se levanto el primer fragmento. Para el segundo fragmento se utilizaron los oligonucleótidos MutACO3, MegACO2 y MutACO4. El tercer fragmento del gen fue ensamblando utilizando la misma técnica de amplificación-ligación-amplificación antes descrita. La primera mitad del fragmento tres es un fragmento amplificado utilizando la técnica de megaprimers con los oligonucleótidos MutACO5, megACO3 y megACO4. La mitad restante es el fragmento resultado de la amplificación utilizando los oligonucleótidos AC89Fwd y ACCOrev. Para ensamblar los tres fragmentos seguimos la misma lógica que en el caso anterior. El producto final de la reacción de amplificación se analizó en un gel de agarosa al 1%. El fragmento de la talla esperada que se obtuvo después de la amplificación se extrajo del gel de agarosa al 1% utilizando el estuche QiaQuick PCR purification Kit (Qiagen).

Las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador PCR SPRINT (Termo). La mezcla de reacción consistió en: 5 ng de plásmido, 5 U de Taq-DNA polimerasa (Altaenzymes), 10 pmol de cada oligonucleótido (excepto en los casos en donde se realizó la técnica de "megaprimer"), Buffer Taq 1x, MgCl₂ 2.5mM y 2.5 mM de dNTPs en un volumen final de 50 µL.

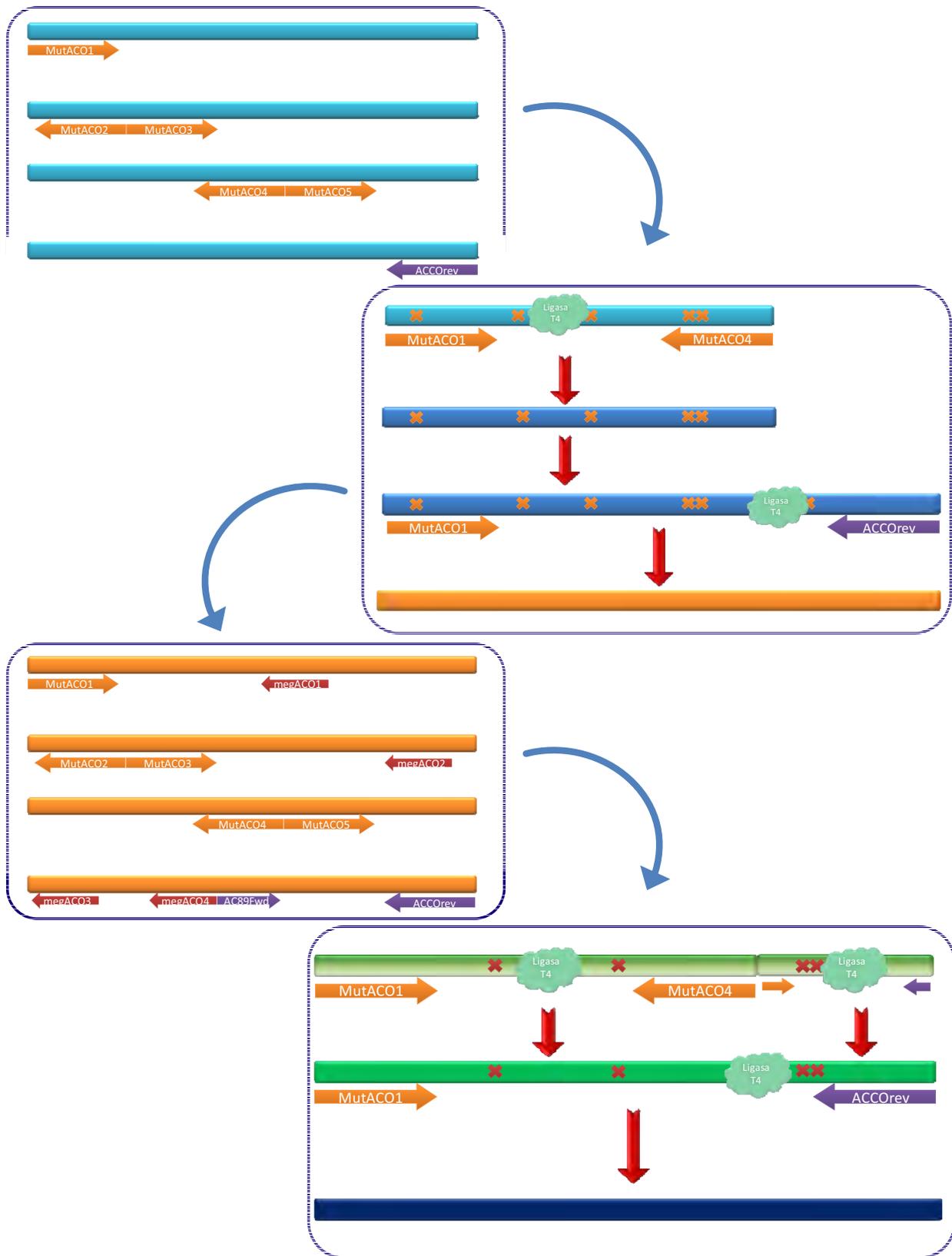


Fig. 11. Metodología para generar la polimutante pGEM-MegR

8. Transformación de *E. coli*.

Las construcciones pGEM-ACCO, pGEM-Ahis y pGEM-MEGR que se purificaron previamente se desalaron por precipitación con butanol y etanol, el botón resultante fue disuelto en 10 μ l de H₂O tetradestilada. La transformación se realizó por electroporación de aprox. 100 ng de vector, en 60 μ L de células competentes *E. coli* DH5 α sometidas a un choque eléctrico de 1.8 V en un electroporador (Bio-Rad) ajustado a 25 μ F y 200 Ω . Las células se recuperaron agitándose durante una hora a 37°C en 1mL de medio LB.

Posteriormente se inocularon en placas de medio LB con el/los antibióticos correspondientes y se incubaron a 37° C hasta encontrar colonias aisladas. Los vectores de expresión fueron transformados en la cepa *E. coli* BL21(DE3)pLysS (Novagen) y Rosetta(DE3) (Novagen) siguiendo el protocolo de transformación TSS utilizando células competentes de calcio (Chung *et al.*, 1989).

9. Análisis de la expresión de la ACCO, ACCO-His y ACCO-metis.

Las clonas transformadas con el pET-A13, pET-Ahis y pMETIS se cultivaron en medio LB con ampicilina 20 μ g ml⁻¹ y cloramfenicol 35 μ g ml⁻¹, a 37° C hasta una OD₆₀₀ de 0.4, una vez alcanzada esta concentración al cultivo se le adicionó Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración de 2 mM . El cultivo se incubó durante dos horas más a una temperatura de 18° C.

Las células fueron cosechadas por centrifugación a 4000 rpm por 15 min a 4° C. La biomasa producto de la cosecha se disolvió en amortiguador de lisis [HEPES 25 mM (pH 7.2), ditionitrotiol (DTT) 5mM, 10% glicerol e inhibidor de proteasas Complete (Roche)]. El paquete celular fue roto mediante cuatro pulsos ultrasónicos de 1 min, el extracto obtenido fue centrifugado a 4° C, separando la fracción soluble de la insoluble. Ambas fracciones se analizaron mediante electroforesis en un gel SDS-PAGE al 12%.

10. Inmuno detección tipo "Western blot"

Para corroborar la fracción en la que se encontraba la ACCO se realizó un inmunoensayo tipo Western utilizando el anticuerpo monoclonal Anti-His₆ acoplado a peroxidasa (Roche).

Mediante una transferencia semiseca en una cámara SemiPhor (Hoefer®). La transferencia se realizó a 0.8 mA/cm² durante 1.5 h. Se utilizó una membrana de nitrocelulosa Hybond-C Extra de Amersham Biosciences ®.

Para la inmunodetección se incubó la membrana durante 12 h en una solución de TBST [TBST: TBS (Tris 10mM, NaCl 150mM), Tween 20 al 0.05%] con leche descremada en polvo al 5%. Se realizaron 3 lavados de 10 min con TBST y posteriormente se incubó la membrana durante 1 h en agitación con una solución de TBST y leche descremada al 0.1% y una dilución del anticuerpo 1:10000. Se lavó la membrana 2 veces por 10 min con TBST. La actividad de peroxidasa se reveló con TMB (de Zymed®).

La inmunodetección anti-ACCO se realizó mediante un ensayo tipo Western utilizando anticuerpos policlonales anti -ACCO para *S. lycopersicum* y para *P. x hybrida* amablemente proporcionados por Nadia El Bakkali Taheri y Jalila Simaan del Laboratorio de Biociencias de la Universidad Paul Cezanne (Aix Marsella, Francia). Para la detección el gel de poliacrilamida se transfirió a una membrana de nitrocelulosa mediante una transferencia en amortiguador TrisGlicina 25 mM, glicina 192 mM; pH 8.3. La transferencia se realizó en una cámara BioRad a 4 °C, 100 voltios y amperaje variable. Para la detección la membrana de nitrocelulosa se bloqueó utilizando leche descremada al 5%, durante hora y media a 37° C. una vez bloqueada la membrana, se lavo tres veces con TBST por periodos de 10 minutos por lavado. La membrana de nitrocelulosa se incubó con el primer anticuerpo en una mezcla 1/100 de la mezcla: suero (anti-ACCO)/ TBS (5% leche descremada). La membrana se incubó con el primer anticuerpo durante una hora a temperatura ambiente, posteriormente se realizaron tres lavados con TBST por periodos de 10 min. Una vez terminados los lavados la membrana se incubó con un segundo anticuerpo anti-conejo conjugado a la peroxidasa de rábano picante HRP (Promega) en una dilución 1/500 en TBS, durante una hora a temperatura ambiente. Una vez terminada la incubación con el segundo anticuerpo, se procedió a realizar tres lavados de 10 min cada uno con TBST. La actividad de peroxidasa se reveló utilizando el estuche *Supersignal Westpico chemiluminescent substrate for detection of HRP* (Pierce). La quimioluminiscencia se reveló utilizando placas fotográficas CLXPosure (Pierce) o Kodak XOMAT la cual se reveló mediante el proceso de revelado fotográfico habitual.

11. Purificación.

Los cultivos para la purificación se realizaron como se describió previamente, en volúmenes de 5 L para esto se utilizó un fermentador de 10 L que se inoculó con un litro de cultivo que se dejó crecer durante 12 h a 37° C. De igual manera los 5 L de cultivo se llevaron a una OD₆₀₀ de 0.4 a 37° C, 0.33vvm y 300 rpm. Una vez que el cultivo alcanzó la densidad óptica deseada se continuó con el mismo procedimiento de inducción y cosecha.

El paquete celular fue cosechado por ultracentrifugación utilizando una centrifuga minisharple, el sobrenadante se desechó y el paquete celular se disolvió en amortiguador de lisis. Las células se rompieron mediante sonicación como se describió previamente. Se centrifugó por 15 min. a 13000 rpm y se recuperó el sobrenadante.

Como primer paso de la purificación se utilizó una columna de intercambio aniónico Macro-Prep High-Q (Bio-rad), previamente equilibrada con amortiguador HEPES 25mM, pH 7.2, 10% glicerol. La columna se cargó con el sobrenadante y fue lavada con el amortiguador de equilibrio utilizando un flujo de 1 ml min⁻¹. La fracción retenida se eluyó con un gradiente lineal de 0-1 M NaCl en el mismo amortiguador.

La fracción seleccionada se cargó en una columna de intercambio catiónico Macro-Prep High-S (Bio-rad), previamente equilibrada con amortiguador HEPES 25mM, pH 7.2, 10% glicerol. La columna se lavó en el mismo amortiguador utilizando un flujo de 1 ml min⁻¹. La fracción retenida se eluyó utilizando un gradiente lineal de NaCl 0-1 M en el mismo amortiguador.

La fracción seleccionada después de la cromatografía de intercambio catiónico se concentró utilizando una membrana con corte de 10kDa (Amicon, Millipore). La solución concentrada se cargó en una columna Sephacryl 300HR, para una cromatografía de exclusión molecular, la columna se equilibró previamente en Buffer HEPES 25mM, pH7.2, NaCl 50 mM y 10% glicerol.

Para determinar la identidad y pureza de las fracciones a través de los diferentes pasos cromatográficos, se realizaron ensayos de electroforesis en condiciones desnaturizantes.

12. Ensayos de actividad

La actividad de la ACCO se evaluó de tres diferentes maneras.

Determinación de Cianuro. Para la determinación de cianuro en solución se utilizó el estuche de Merckoquant Test Cianuros (MERCK). Los ensayos se llevaron a cabo en un volumen

de reacción final de 1ml en amortiguador HEPES 25 mM, pH 7.2, 10% glicerol, a la reacción se le añadió ACC 1.25 mM; ácido ascórbico 8 mM(Zhang *et al.*, 1995). La ACCO se incubó previamente con cantidades equimolares de $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ como se reporta anteriormente(Tayeh *et al.*, 1999;Thrower *et al.*, 2001).

Consumo de oxígeno. El consumo de oxígeno se evaluó utilizando un electrodo Oxygraph (Hansatech). La mezcla de reacción se preparó como se describió anteriormente. La temperatura se mantuvo a 25° C, utilizando un recirculador de agua Julabo F25.

Consumo de ACC. Para analizar el ACC residual se realizó una cromatografía en HPLC utilizando un cromatografo Waters 600 controller acoplado a un detector de arreglo de diodos con una longitud de onda de 254nm. La muestra se cargó en una columna Nucleosil 120-5 C18 y se eluyó con un gradiente lineal de 0-50% acetonitrilo (ACN) con 0.1% ácido trifluoroacético (TFA). Los aminoácidos se derivatizaron utilizando fenil iso-tiocianato (PITC). La mezcla de reacción estándar se dejó incubar a 25° C de esta se tomaron alícuotas a diferentes tiempos y se utilizaron para derivatizar el ACC residual.

Producción de etileno. La detección de etileno se realizó mediante cromatografía de gases. Las reacciones se ajustaron a 200 μl , utilizando los sustratos a una concentración de $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ 80 μM , ácido ascórbico 8 mM, ACC 1.25 mM, HCO_3^- 15 mM en amortiguador HEPES 125 mM; pH 7.2 y 10% glicerol. La reacción se incubó en agitación durante 1h a 29° C. La actividad se determinó utilizando un cromatógrafo de gases Chrompack CP 9002 con una columna Porapak Q 20/100 acoplado a un detector de ionización de flama con nitrógeno como gas acarreador (25.30 ml min^{-1}). Las condiciones del cromatógrafo fueron inyector 110° C, estufa 80° C y detector 250° C (Zhang *et al.*, 1995).

Para comparar las mediciones de etileno, se utilizo como control la recombinante de *P. x hybrida* proporcionada por Nadia El Bakkali Taheri y Jalila Simaan del Laboratorio de Biociencias de la Universidad Paul Cezanne (Aix Marsella, Francia), ensayándola bajo las mismas condiciones.

Resultados

Análisis bioinformático.

Para obtener la secuencia de un gen homólogo a las ACCO previamente utilizadas por los grupos de Schofield, Que Jr. y Klinman que tuviera la mayor similitud en secuencia de aminoácidos. Se realizó una búsqueda mediante Blast en el sitio del NCBI utilizando como semilla la secuencia de aminoácidos de la ACCO de *Solanum lycopersicum* pTOM13 y el blast se dirigió contra el genoma de *A. thaliana*. Con las secuencias que arrojó el blast se hizo un alineamiento múltiple (Fig. 12) para observar las diferencias en la secuencia de aminoácidos en cada uno de los caso, conjuntamente se elaboró una tabla de similitud para las secuencias alineadas (Tabla 3).

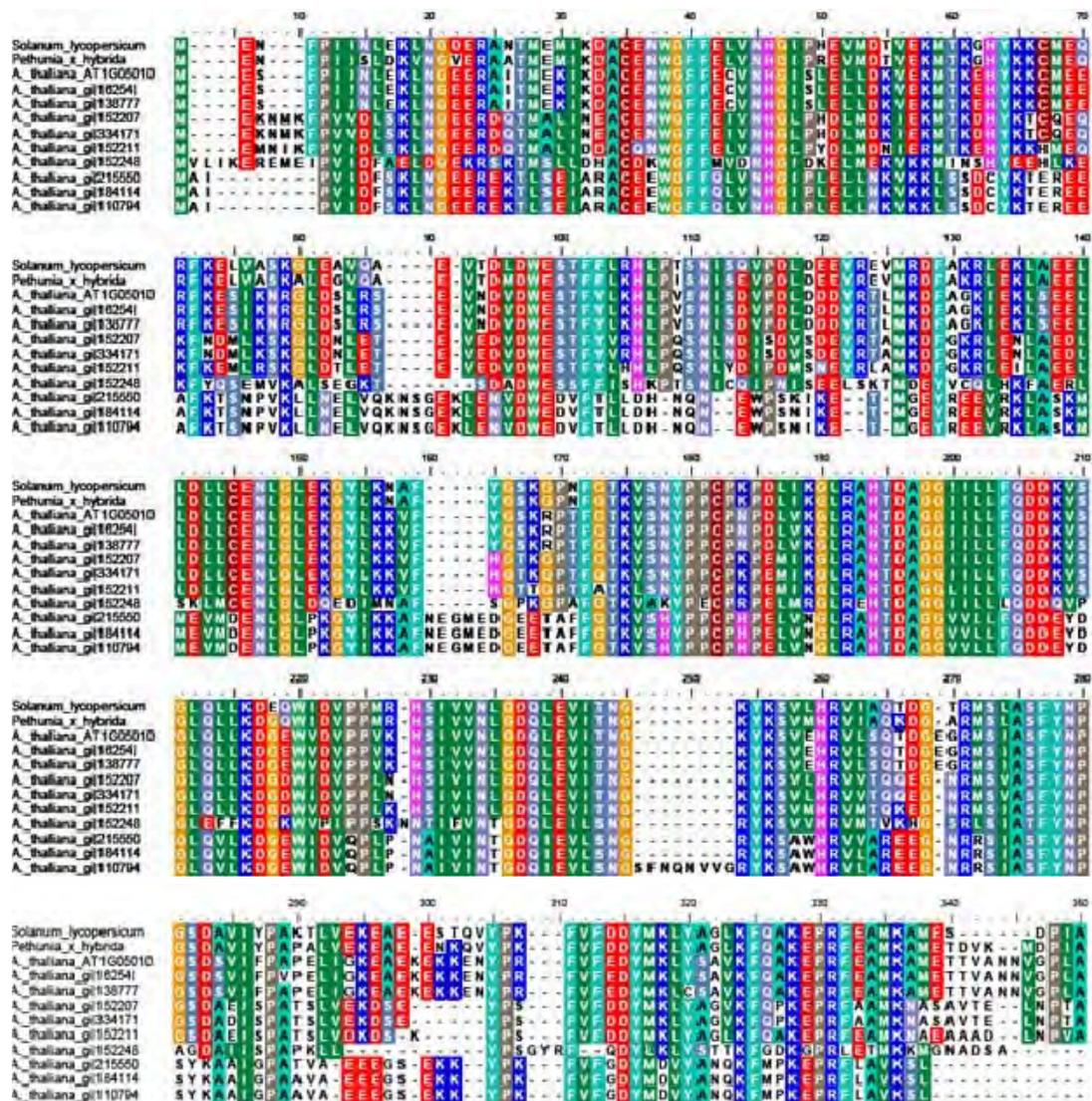


Fig. 12. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos producto del blast contra el genoma de *A. thaliana*

Tabla 3. Porcentaje de similitud para la secuencia de aminoácidos

	<i>S. lycopersicum</i>	<i>P. x hybrida</i>	<i>A. thaliana</i> AT1G05010
<i>S. lycopersicum</i>	ID	0.92	0.75
<i>P. x hybrida</i>	0.92	ID	0.76
<i>A. thaliana</i> AT1G05010	0.75	0.76	ID
gi 16254	0.75	0.75	0.99
gi 13877785	0.75	0.75	0.99
gi 15220770	0.69	0.68	0.66
gi 3341717	0.69	0.68	0.66
gi 15221170	0.69	0.69	0.67
gi 15224803	0.45	0.45	0.44
gi 21555054	0.47	0.47	0.47
gi 18411485	0.47	0.47	0.47
gi 11079484	0.46	0.46	0.46

Este análisis hizo posible discriminar al homólogo con mayor grado de similitud dentro del genoma de *A. thaliana* con respecto a *S. lycopersicum* y *P. x.hybrida*. Se eligió clonar el gen AT1G05010 debido a que comparte un 75% de similitud con la secuencia de aminoácidos de las enzimas utilizadas por otros grupos de trabajo.

Clonación de la ACCO

Se obtuvo la clona Pda01189 de RIKEN Bio Resource Center, la cual posee la secuencia del cDNA correspondiente a la proteína codificada por el gen AT1G05010 de *A. thaliana Columbia*. Como se mencionó anteriormente, no se reporta en la literatura ningún problema con la expresión de las ACCO en sistemas procariontes, por lo que decidimos amplificar sin modificaciones el gen de la ACCO. La secuencia del gen AT1G05010 se amplificó usando el par de oligonucleótidos diseñados específicamente conteniendo sitios de restricción para NdeI y EcoRI. Se amplificó un fragmento que posee la talla esperada para la ACCO el cual se purificó de gel utilizando el estuche QiaQuick PCR purification Kit (Qiagen). Una vez purificado, el fragmento se ligó al vector p-GEM-T Easy Vector (PROMEGA) generando el plásmido pGEM-ACCO que se clonó en la cepa *E. coli* DH5a para la propagación del plásmido. El plásmido pGEM-ACCO se purificó y se mandó secuenciar. En la secuencia resultante se encontraron dos diferencias al compararla con la secuencia reportada (T285C y A418G) que codifican para los

cambios en la secuencia de aminoácidos D189G e I121V. Es posible que estos cambios no presenten efectos significativos en la actividad de la proteína debido a que no se encuentran dentro del sitio activo.

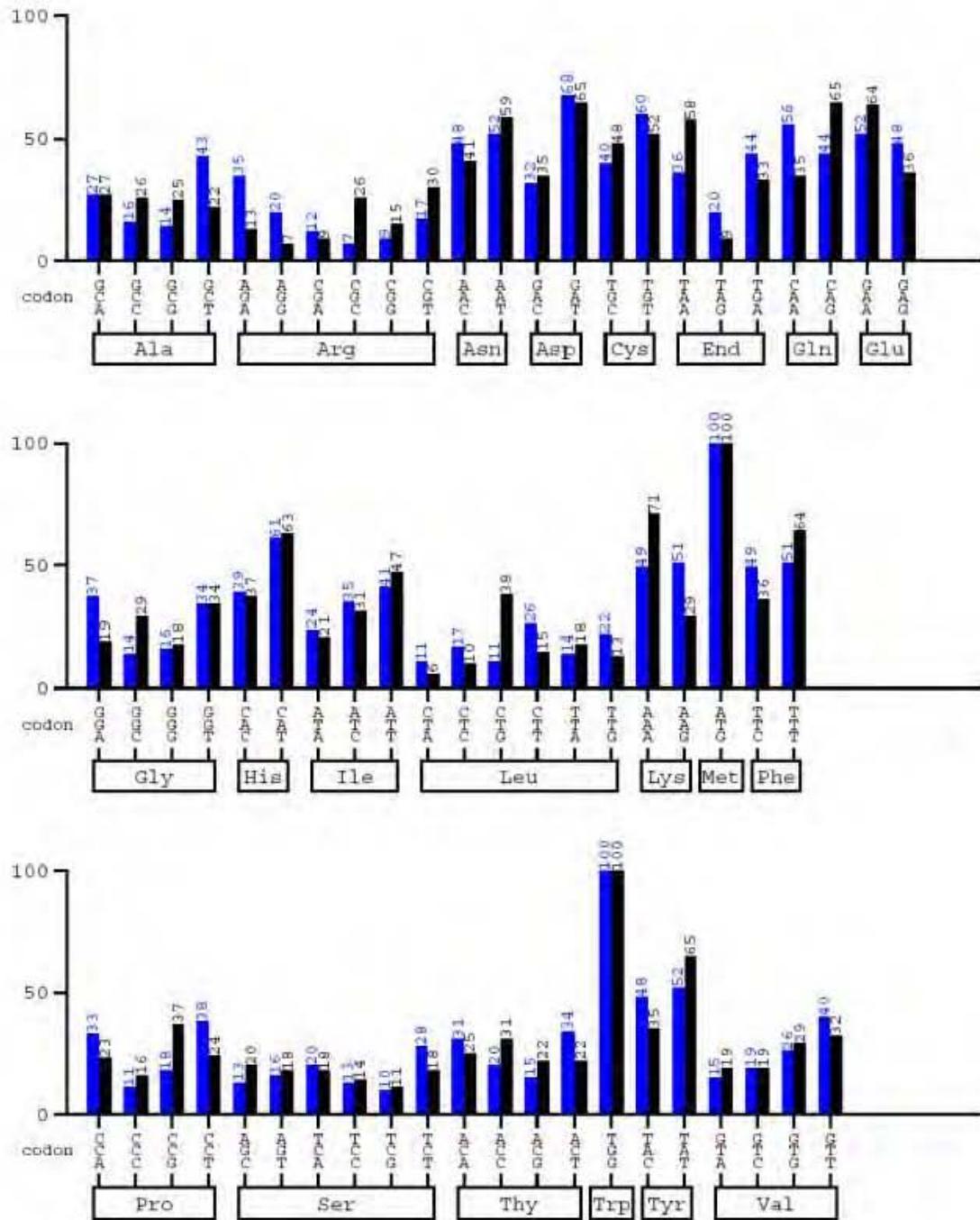
Para la expresión en *E. coli* se utilizó el vector de expresión pET-32a(+) (5900 pares de bases) con resistencia a ampicilina (Ap), un promotor fuerte dependiente de la polimerasa de T7, con el origen de replicación del pBR322. Este sistema permite la expresión de la secuencia insertada de manera dependiente de IPTG en una cepa que contenga un vector con el promotor T7/*lac*. El pGEM-ACCO y el vector de expresión pET-32a se digirieron por separado con las enzimas de restricción EcoRI y NdeI. Los fragmentos de la talla esperada para ambos casos se purificaron de banda y se ligaron.

El producto de la ligación fue utilizado para transformar la cepa *E. coli* DH5α. De las clonas obtenidas se eligieron trece colonias para hacer una amplificación de colonia con los oligonucleótidos diseñados para la secuencia codificante. Al verificar los productos de amplificación sólo una de las clonas presentó el fragmento de la talla esperada; de esta clona se purificó el plásmido y se verificó por digestión con las enzimas de restricción EcoRI y NdeI. Ésta construcción fue nombrada pET-A13. Para la expresión de la ACCO en la cepa *E. coli* BL21(DE3)pLysS se transformó el plásmido pET-A13 y se indujo la expresión de la ACCO utilizando 2mM de IPTG. La expresión de la proteína recombinante se analizó por un gel desnaturizante de las fracciones soluble e insoluble del cultivo.

En nuestro caso, la síntesis de la proteína expresada por el pET-A13 en la cepa *E. coli* BL21(DE3)pLysS fue menos eficiente de lo esperado, ya que, bajo el promotor de la polimerasa T7 se esperaba una banda de proteína mayor a la obtenida. Mediante los estudios electroforéticos y asumiendo una masa molecular de 36.7 kDa para la proteína deducida a partir de la secuencia, nos dimos cuenta que la ACCO se estaba expresando pero a niveles demasiado bajos.

Después de realizar diferentes ensayos para mejorar la expresión y al no encontrar una condición que permitiera llevar a cabo la sobre-expresión de la ACCO, consideramos que el problema podría deberse al uso diferencial de codones entre *E. coli* y *A. thaliana* (Gráfica 1). Partiendo de esta hipótesis, y mediante el uso de un algoritmo que permite predecir la efectividad de la traducción de diferentes secuencias en *E. coli* encontramos que existe un número significativo de codones potencialmente conflictivos en la secuencia de la ACCO para su

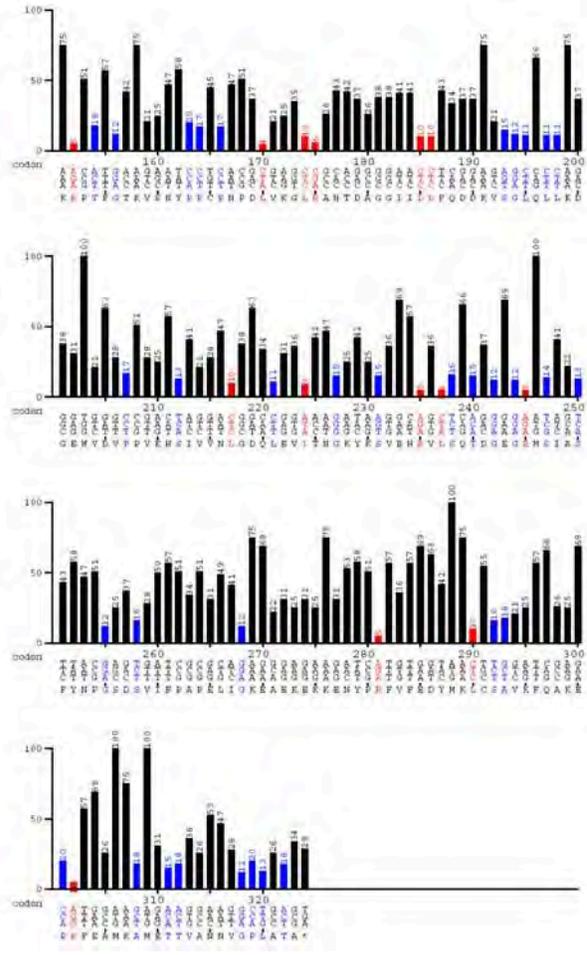
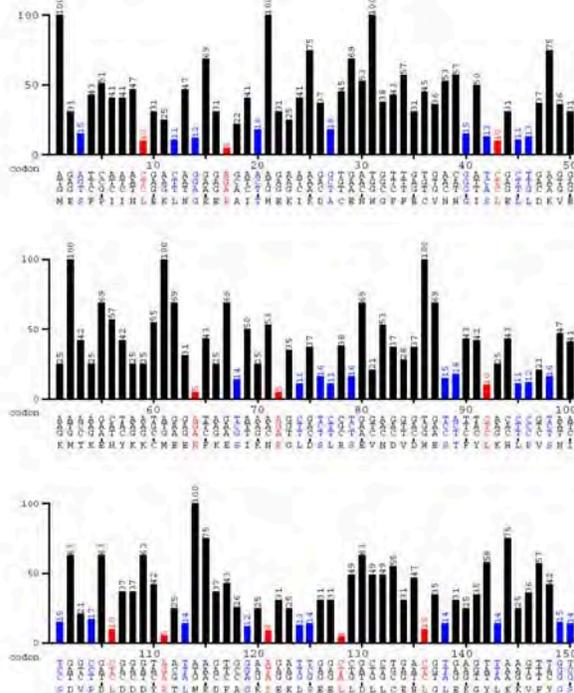
correcta expresión. Del análisis obtuvimos que los codones CTC, AGA, CTA, ATA, CGA y AGG (Gráfica 2) podrían ser la causa de la baja eficiencia en la expresión.



Gráfica 1. Comparación de la frecuencia del uso de codones para (azul) *A. thaliana* y (negro) *E. coli*

ACCO codif
sequence derived from Arabidopsis_thaliana
Codontable:
Escherichia_coli
Ordinate (y-axis): frequency

www.gcuu.de
created: 22.10.2007



Gráfica 2. Predicción de eficiencia de traducción para la secuencia codificante de la ACCO de *A. thaliana* basada en la frecuencia del uso en *E. coli*.

Para contener de manera rápida con la condición de baja expresión debida a las diferencias en el uso de codones, se decidió utilizar la cepa *E. coli* Rosetta(DE3) (Novagen). Esta cepa que posee un plásmido que codifica para cuatro tRNAs de bajo uso en *E. coli* (AGA, AGG, AUA, CUA, GGA, CCC y CGG) (Fig. 13). Aunque esta cepa contiene solo 4 de los 6 tRNAs de baja utilización en nuestra secuencia decidimos utilizarla para evaluar una posible mejora. La cepa se transformó con el plásmido pET-A13 y la expresión de la proteína se analizó de la misma manera que para la construcción anterior. Aunque existía un incremento aparente en la acumulación de una proteína del peso esperado nos encontramos con dificultades para la interpretación de los mismos pues el producto del gen que codifica para la ACCO tiene la misma migración relativa que el producto del gene lacI que se encuentra en el vector de expresión (36.7 y 37.5 kDa, respectivamente como se observa en la Fig. 14).

Codón	Presencia en pRARE
CTC	✗
CGA	✗
CTA	✓
ATA	✓
AGA	✓
AGG	✓

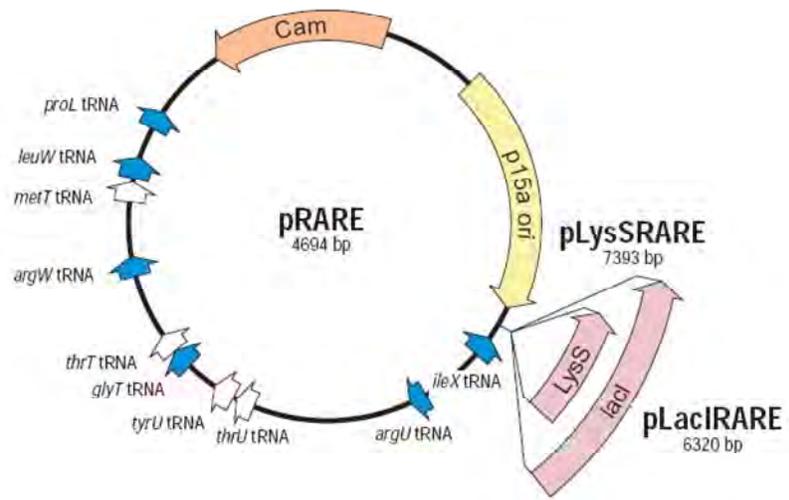


Fig. 13. Representación esquemática del pRARE incluido en Rosetta. En la tabla del lado izquierdo se leen los codones problema que se encuentran en la secuencia de la ACCO de *A. thaliana* así como su presencia en pRARE.

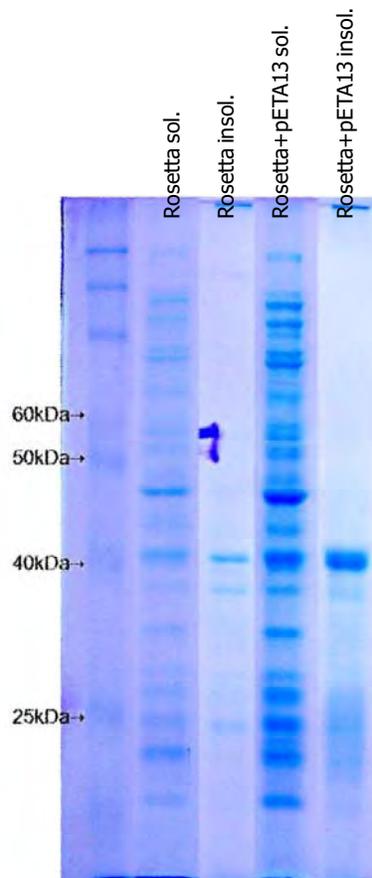


Fig. 14. SDS-PAGE pruebas de expresión con Rosetta. Los primeros dos carriles corresponden a la cepa hospedera y los siguientes dos a la cepa con la construcción pETA13.

Para dilucidar si el sistema de expresión utilizado estaba funcionando, se hizo una construcción control conteniendo una cola de histidinas en el extremo carboxilo de la ACCO (H₆). Para esta construcción se procedió de la misma forma que para la construcción pET-A13, es decir, se diseñó un oligonucleótido 3' que nos permitiera eliminar el codón de término propio de la secuencia y fusionar con el vector de tal forma que la fase de lectura empatara con la cola de histidinas codificada en el vector. De igual forma que en la construcción anterior, el fragmento amplificado se purificó y se ligó al vector pGEM-T Easy (PROMEGA) generando el plásmido pGEM-Ahis que se clonó en la cepa *E. coli* DH5α. El pGEM-Ahis se digirió con las enzimas de restricción EcoRI y NdeI; de igual manera se digirió el vector de expresión pET-32a(+). Los fragmentos de la talla esperada para ambos casos se purificaron de banda y se ligaron. Como resultado de la ligación se generó el plásmido pGEM-Ahis con el cual se transformó la cepa *E. coli* DH5α. Las clonas que dieron positivo a la transformación se analizaron mediante amplificación de colonia y de aquellas que se obtuvo un producto de la talla esperada se purificó el plásmido y se mandó secuenciar. El plásmido pET-Ahis13 se utilizó para transformar la cepa *E. coli* Rosetta(DE3) en la cual se analizó la expresión de la ACCO haciendo inmunoensayos tipo Western blot (Fig. 15).



Fig. 15. Inmunoensayo de las fracciones soluble e insoluble de (WT) *E. coli* Rosetta, (pET) Rosetta transformada con pET-32a(+), (pETA13) Rosetta transformado con la construcción pETA13, (pEThis) Rosetta transformada con la construcción pET-Ahis, y (C+) una proteína que da positivo para el anticuerpo anti-His. En todos los caso el asterisco denota la fracción insoluble.

Después de confirmar tanto la expresión de la ACCO-His mediante ensayos tipo western como su localización en la fracción soluble, pudimos constatar que el sistema de expresión estaba funcionando correctamente, la expresión en Rosetta(DE3) permite la producción de la ACCO recombinante pero en cantidades muy bajas respecto a lo esperado. Este resultado era un indicio de que todavía teníamos problemas en la expresión y los atribuimos a limitaciones a nivel de traducción originadas por los codones de bajo uso restantes.

Dado que no existe ninguna variante del plásmido Rosetta que contenga los dos tRNAs que restaba por subsanar, existían dos posibles formas de contender con el problema. Una de ellas era construir un derivado de Rosetta con 6 tRNAs y la otra era la sustitución de todos los codones conflictivos en la secuencia del gen. Dado que el plásmido Rosetta ya es suficientemente complejo y que posiblemente la manipulación adicional pudiera ser contraproducente, optamos por la segunda alternativa. Para esto se realizaron 11 mutaciones puntuales en la secuencia codificante de la ACCO de tal manera que los codones problema (CTC y CGA) fueran reemplazados a lo largo de toda la secuencia por sus sinónimos de alta expresión en *E. coli* (CTG y CGT, respectivamente).

Para el cambio en el uso de codones la estrategia seguida fue introducir las mutaciones mediante el uso de oligonucleótidos por medio de rondas de amplificación-ligación-amplificación. El nuevo fragmento denominado "MegR", se purificó de banda, una vez purificado; el fragmento MegR se ligó al vector pGEM-T Easy Vector (PROMEGA) generando el plásmido pGEM-MEGR el cual se utilizó para transformar células electro-competentes *E. coli* DH5α. La existencia de inserto en las clonas obtenidas se verificó mediante amplificación de colonia; aquellas en las que se observó producto de la talla esperada fueron utilizadas para extraer plásmido. Los plásmidos puros se volvieron a revisar por restricción con las enzimas EcoRI y NdeI; aquellos que presentaron inserto fueron mandados a secuenciar para verificar la existencia de las mutaciones y la conservación del resto de la secuencia (Fig. 16 y 17).

El pGEM-MEGR se digirió con las enzimas de restricción EcoRI y NdeI, de igual manera se dirigió el vector de expresión pET-32a(+) con las mismas enzimas. Los fragmentos de la talla esperada para ambos casos se purificaron de banda y se ligaron utilizando la ligasa T4, generando el plásmido pMETIS el cual se utilizó para transformar *E. coli* Rosetta(DE3).

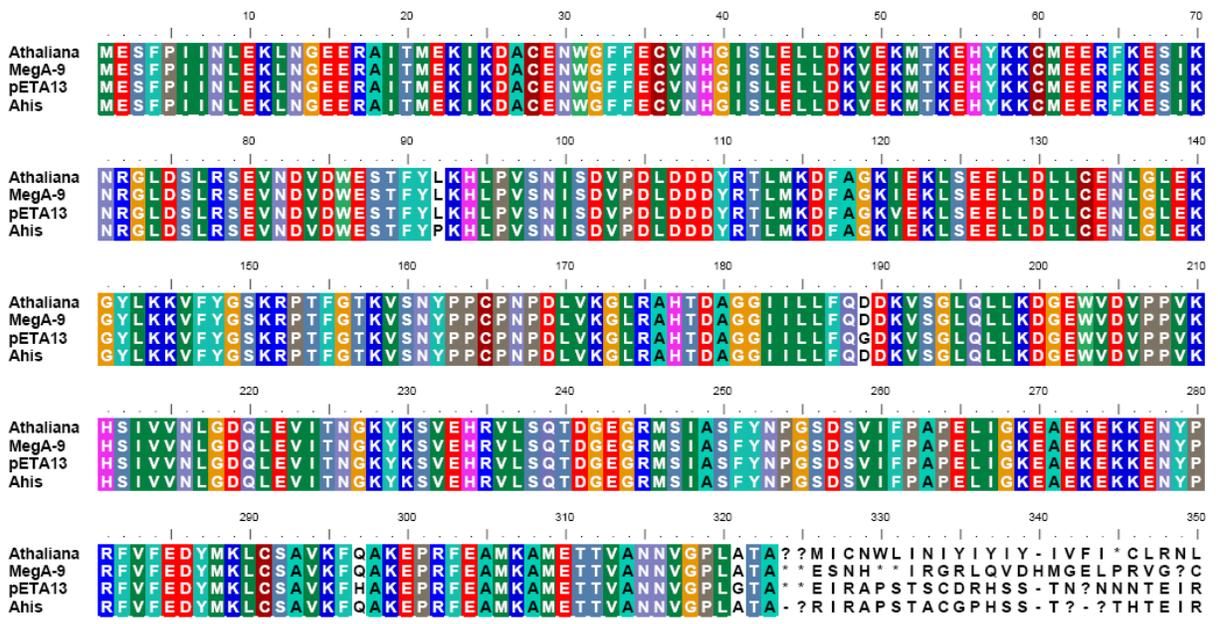


Fig. 16. Alineamiento de secuencia de aminoácidos de la ACCO de *A. thaliana* comparada con las construcciones pET-MEGA9, pET-A13 y pET-Ahis13

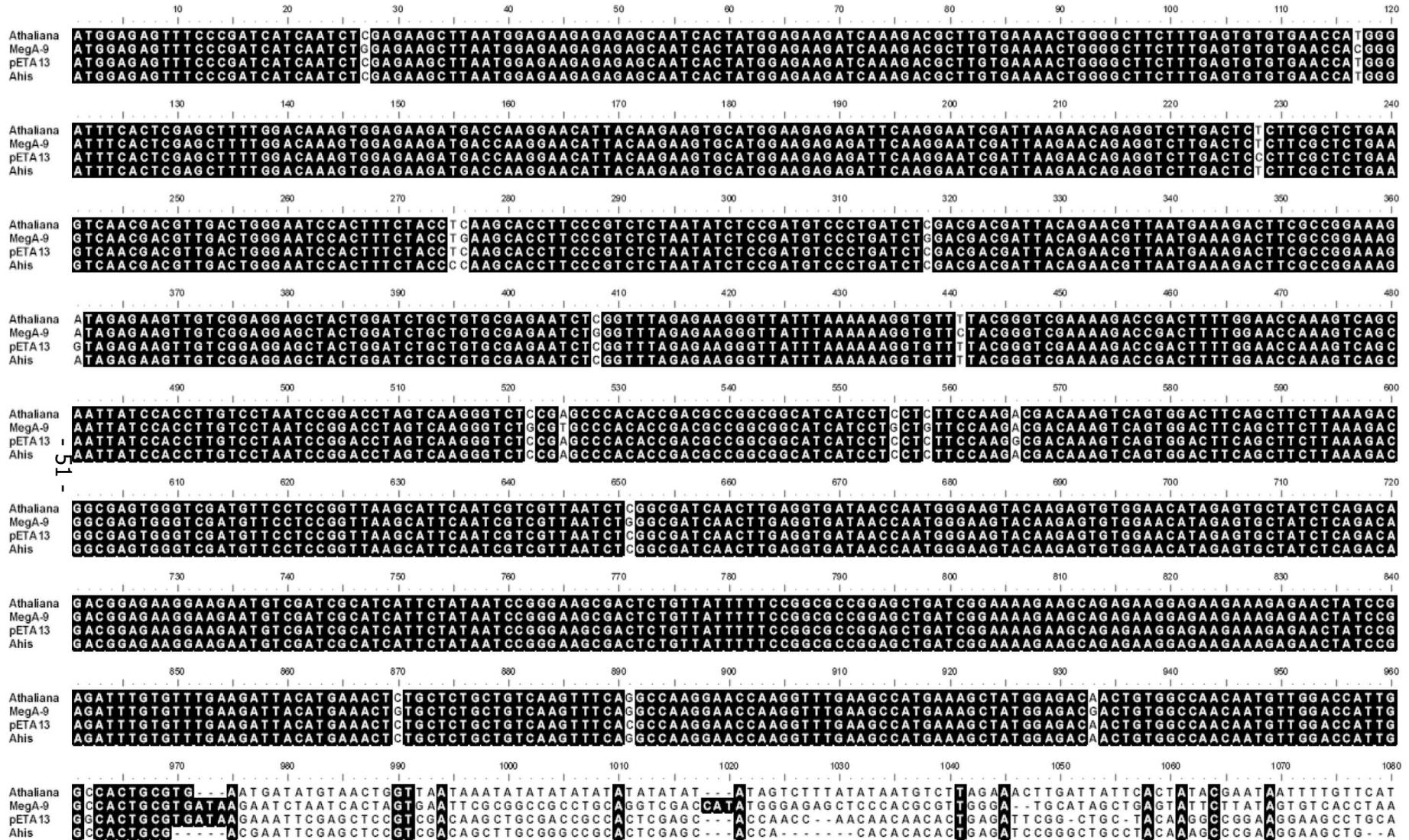


Fig. 17. Alineamiento de la secuencia obtenida para la polimutante pEM-MEGR comparándola con las secuencias de las construcciones pET-A13 y pET-AHis, así como con la secuencia reportada para el gen

Expresión y Purificación de la ACCO

Una vez que se demostró la expresión de la ACCO con las diferentes construcciones se hicieron pruebas variando la concentración de IPTG, la temperatura y los tiempos de incubación. El protocolo de la expresión consistió en: Inducción de la ACCO una vez que el cultivo alcanza una densidad óptica de 0.4 utilizando IPTG en una concentración final de 2 mM, disminución de la temperatura hasta 25° C e incubación durante 4 horas. En todos los casos la expresión de la proteína se verificó mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida SDS (PAGE). En la figura 18 puede observarse claramente que los niveles de expresión de la polimutante son mayores que los de la construcción pET-A13 y muy similares a los obtenidos con la variante con cola de histidinas.

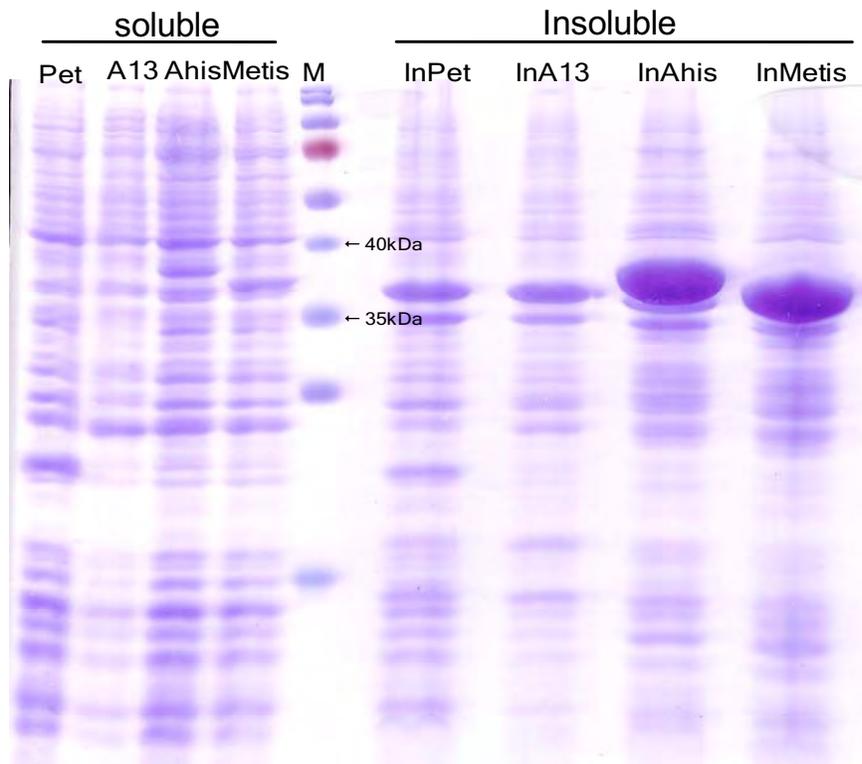


Fig. 18. SDS-PAGE pruebas de expresión para (Pet) cepa hospedera transformada con pET-32a(+), (A13) Rosetta transformada con la construcción pET-A13, (Ahis) Rosetta transformada con la construcción pET-Ahis, y (Metis) Rosetta transformada con la polimutante Metis.

Una vez establecido el protocolo de expresión, se probaron los diferentes protocolos de purificación simulando las condiciones que se reportan previamente para la obtención de la ACCO con poco éxito. Ya que ninguna de las estrategias de purificación que se utilizan previamente permiten obtener nuestra recombinante, decidimos generar nuestro propio

protocolo de acuerdo al siguiente esquema: un primer paso en una columna de intercambio aniónico Macro-prep High Q, seguida de una cromatografía de intercambio catiónico Macro-prep High S y finalmente un refinamiento por una columna de exclusión molecular. En todos los casos las fracciones se seleccionaron después de ser analizadas mediante electroforesis desnaturalizante y se buscó la banda que corresponde al peso molecular estimado (37.5 kDa). Después de someterse a los diferentes pasos cromatográficos fue posible obtener una preparación en la que la proteína ACCO representa 90% de la proteína total con un contenido proteico de 1.4 mg (Fig. 19).

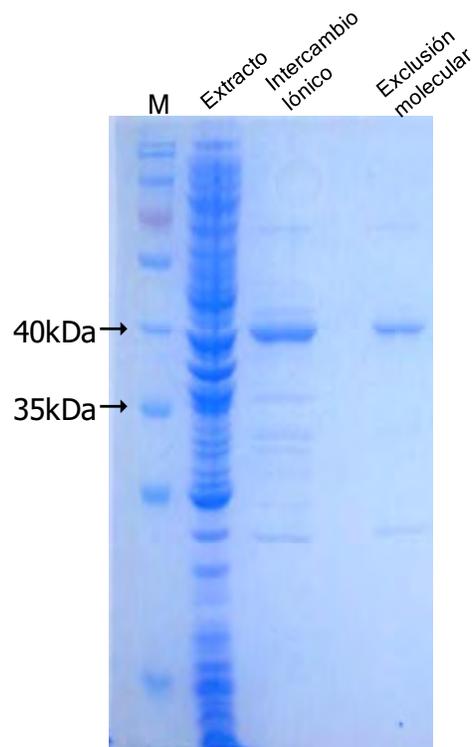


Fig. 19. SDS-PAGE Fracciones seleccionadas de los diferentes pasos de purificación

Una vez realizada la purificación de la ACCO de *A. thaliana* se llevó a cabo un ensayo de inmunodetección utilizando dos anticuerpos anti-ACCO que nos proveyó el grupo de la Dra. Simaan, uno dirigido contra la enzima de jitomate y otro contra la de petunia. Ambos anticuerpos reconocieron la banda mayoritaria que obtuvimos en nuestra purificación, tal como se puede observar en la figura 20. Con este resultado concluimos que efectivamente la especie que estamos purificando es la ACCO.



Fig. 20. Inmuno ensayo de la proteína obtenida después de la purificación contra el anticuerpo anti-ACCO de jitomate. (ACCOt) ACC oxidasa de jitomate, (ACCO A. thaliana) ACCO obtenida de la purificación de Rosetta transformada con la construcción pMetis.

Estimación de la actividad enzimática

Si observamos la estequiometría reportada para la reacción de la ACCO existen cinco posibilidades para monitorear su actividad: mediante la medición del consumo de sustratos (ACC y O₂) o por la generación de los productos de la reacción (HCN, etileno y CO₂). La discriminación entre CO₂ producido y el CO₂ ambiental implicaría utilizar una marca radioactiva de C¹⁴, por lo que ésta metodología no se exploró, sin embargo todas las demás fueron realizadas.

Consumo de oxígeno

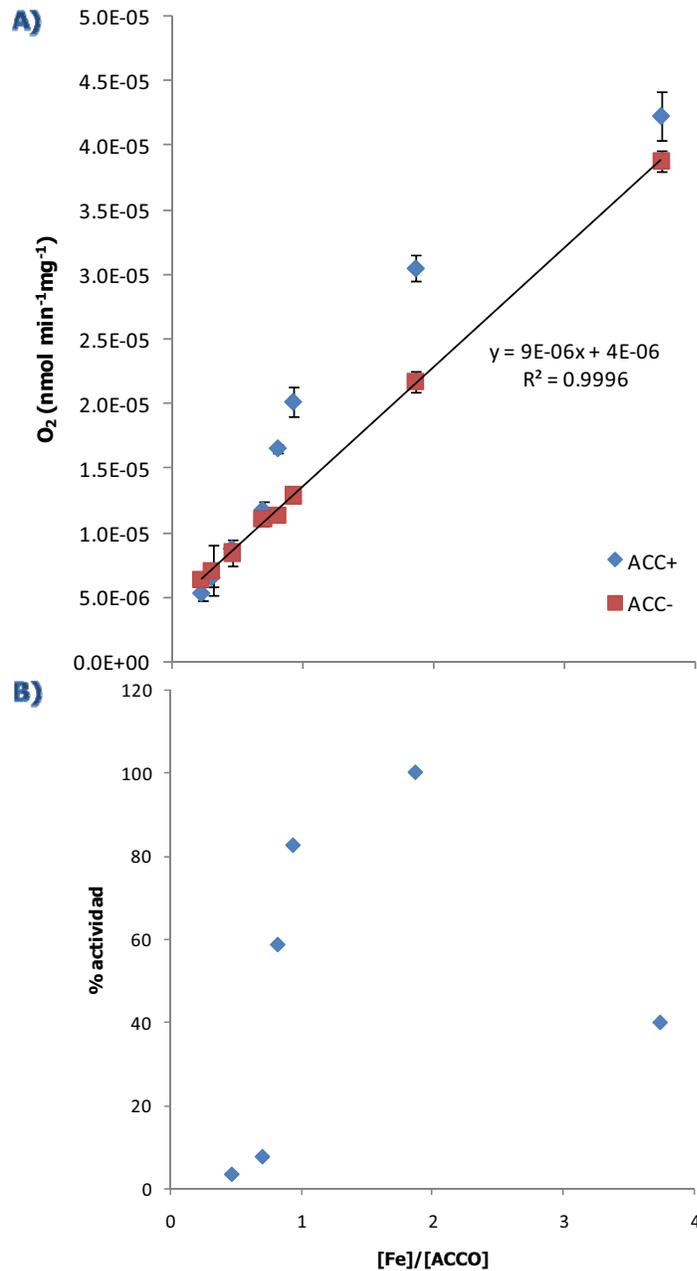
El consumo de oxígeno se evaluó en utilizando un Oxygraph (Hansatech) que permite monitorear en línea la disminución de oxígeno en fase líquida. Utilizar este dispositivo es muy sencillo por lo que decidimos montar las condiciones de reacción utilizando los datos de consumo de oxígeno. Se monitoreó el consumo de oxígeno en amortiguador HEPES 25mM pH7.2, 10% glicerol. Después de evaluar la actividad enzimática utilizando diferentes condiciones de reactivos se establecieron las condiciones de trabajo como: ácido ascórbico 8 mM, ACC 1.25 mM y FeSO_4 2.8 mg ml^{-1} . La temperatura se mantuvo constante utilizando un recirculador de agua a 25° C. Se eligieron estas condiciones de reacción debido a que la actividad de la ACCO se distancia claramente de la señal de fondo de la reacción.

En la gráfica 3 panel A se muestran los datos de consumo de oxígeno para la reacción enzimática así como el consumo de fondo de la reacción, es decir, la tasa de consumo de oxígeno inherente a la mezcla de reacción. Como puede observarse la reacción de fondo presenta una tasa de primer orden dependiente de la concentración de hierro en el medio, mientras que la reacción enzimática asemeja una Michaeliana. En el panel B de la figura podemos observar la actividad una vez sustraído la reacción de fondo, en este recuadro podemos observar que la mayor actividad enzimática se obtiene bajo la relación molar Hierro:Enzima 2:1 así que establecimos ésta como la relación que se utilizará para las pruebas de actividad.

En este experimento se intentan titular los sitios de la enzima que no se encuentren cargados con hierro. Para esto podemos dividir la gráfica en tres secciones diferentes: una primera sección que va de 0-0.75 en donde la reacción enzimática es muy baja debido a que los sitios activos de la proteína no se encuentran totalmente cargados y la reacción de fondo es superior a la reacción enzimática. Una segunda fase que va de 0.75-2 en donde los sitios llegan a saturarse y la actividad enzimática es más intensa. Por último una tercera fase de 2-4 en donde la concentración de hierro en solución es tan elevada que la actividad enzimática se pierde en el fondo. Utilizando estos datos tenemos indicios de la carga inherente de hierro en la proteína sugiriendo que tenemos una carga parcial de la enzima ya que la adición de una fracción molar de Fe cercana a 75% permite separar la actividad en el fondo de la actividad enzimática.

Utilizando estas condiciones se hicieron pruebas preliminares para evaluar la vida media de la enzima, sin embargo, debido a que la disminución de la actividad se llega a enmascarar

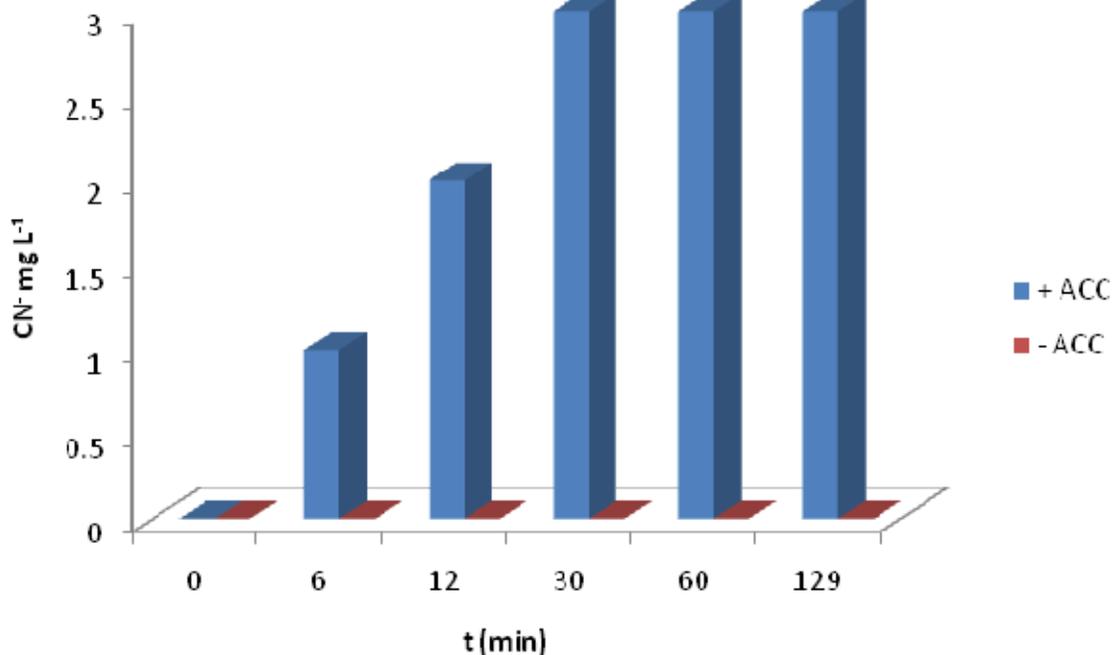
con la reacción química de fondo no es posible estimar la vida media utilizando esta metodología. Además, la necesidad de inyectar oxígeno a la cámara durante el transcurso de los experimentos complica mucho la reproducibilidad de estos.



Gráfica 3. Prueba de actividad de consumo de oxígeno; A) Actividad específica de la ACCO en términos de consumo de oxígeno; (+ACC) mezcla de reacción con ACC y (-ACC) mezcla de reacción sin ACC. B) Porcentaje de actividad al sustraer la reacción de fondo.

Producción de CN^-

Para poder validar que el consumo de oxígeno observado fuera producto de la actividad de la ACCO y no un artificio de la reacción química de fondo se midió la concentración de CN^- de forma semi-cuantitativa utilizando el estuche de prueba para cianuros (MERCK) que tiene su fundamento en la reacción König². En la Gráfica 4 podemos observar la acumulación de cianuro dependiente del tiempo de reacción y de la adición de ACC. La producción de CN^- es una de las pruebas de la actividad enzimática de la ACCO.



Gráfica 4. Prueba de actividad producción de CN^- . (+ACC) mezcla de reacción con ACC y (-ACC) mezcla de reacción sin ACC.

Producción de etileno

La validación última de la actividad de la ACCO implica observar la producción de etileno dependiente del ACC. Para tal efecto se hicieron diferentes pruebas preliminares con tejido vivo, es decir, utilizando pequeñas porciones de distintos frutos climatéricos (p. ej. jitomates y guayabas) siendo posible detectar en el cromatógrafo de gases un pico con el mismo tiempo de retención que el estándar de etileno utilizando el detector FID. En una segunda ronda de

² Los iones cianuro reaccionan con un agente colorante para formar cloruro de cianógeno, que reacciona con ácido-1,3-dimetilbarbitúrico en presencia de piridina para formar una tinción violácea.

experimentos dirigidos a la detección de etileno usando la ACCO recombinante pura contamos con la asesoría de la Dra. Simaan en el laboratorio de Biociencias. Para la detección con FID se utilizó un estándar de 1% de etileno diluido en nitrógeno bajo las condiciones descritas en materiales y métodos bajo las cuales el pico de etileno tiene un tiempo de retención cercano a los 0.54 min. Se prepararon reacciones utilizando 56 μg de ACCO y dejándose incubar con agitación durante una hora a temperatura ambiente. Los datos obtenidos se muestran en la Tabla 4 en donde es posible observar que la señal de etileno depende de ACC, bicarbonato y ácido ascórbico, de igual manera que fue posible observar acumulación de etileno sin adicionar hierro. La actividad específica obtenida para la ACCO de *A. thaliana* es de $0.506 \text{ nM mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$, contrastando con la actividad de la ACCO de *P. x. hybrida* en donde se tiene una actividad específica de $3427.424 \text{ nM mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$.

Condición	Tiempo de retención (min)	Etileno (nM)
Estándar	0.54	$10 * 10^6$
Blanco	ND	ND
Sin Fe	0.55	0.019
2X Fe	0.52	0.028
10X Fe	0.54	0.018
Sin Bicarbonato	ND	ND
Sin ACC	ND	ND
Sin Ácido ascórbico	ND	ND

Tabla 4. Datos de la actividad de producción de etileno. El área bajo la curva es la integración del pico obtenido en el tiempo de retención esperado para el etileno; ND (no detectado) denota la ausencia de señal en los cromatogramas.

Para corroborar la identidad del producto observado, se llevó a cabo la cromatografía de gases acoplada a un detector de masas. Al inyectar una muestra del estándar de etileno concentrado se observó un pico con un tiempo de retención de 2.54 min y el patrón de fragmentación característico del etileno. Después se inyectó una segunda muestra del estándar pero diluida en aire. En esta muestra se obtuvo el mismo tiempo de retención para el etileno, sin embargo, también se observan dos picos previos que parecen ser una mezcla de nitrógeno y etileno con un tiempo de retención cercano a 1.57 min. El patrón de fragmentación de estos

compuestos indica que el mayoritario es nitrógeno con una masa cercana a 28 g mol^{-1} , sin embargo, los compuestos minoritarios no comparten el patrón de fragmentación por lo que se trata de diferentes especies no identificadas. Para la producción de etileno con enzima pura se utilizó el protocolo de Zhang, *et al.*, tal como se describe en materiales y métodos (Zhang *et al.*, 1995). Para una reacción incubada por 12 h se encontraron una serie de picos con valores por debajo de la reacción control sin enzima por lo que no fueron asignados. Sin embargo, si observamos el patrón de fragmentación del pico cercano a 1.57 min encontramos que es muy similar al estándar de etileno diluido en aire. Aunque no pudimos detectarlo, no podemos descartar que el poco etileno producido por la reacción hubiera quedado enmascarado por el pico de nitrógeno del aire. De esta serie de experimentos podemos concluir que, a pesar de su indiscutible sensibilidad, la utilización de un detector de masas no es lo más conveniente para la determinación de etileno en las mezclas de reacción de la ACCO.

Discusión

El objetivo de este trabajo fue la identificación, clonación y expresión de una ACCO de *Arabidopsis thaliana* en *Escherichia coli* como el primer paso para la construcción de un sistema enzimático para la producción de etileno. Para lograr estos objetivos utilizamos información existente en literatura donde se ha reportado la manipulación de ACCOs de otras fuentes, en específico se reporta la producción de ACCOs de plantas en *E. coli* de manera soluble (Zhang *et al.*, 1995; Li *et al.*, 1996). La utilización de una estrategia experimental que se reporta repetidamente en la bibliografía parecería asegurar los resultados deseados, sin embargo, existen diferentes factores que se deben de considerar para cada uno de los casos individuales. Cabe recordar que no obstante se conocen casos de exitosos de producción de proteínas recombinantes a grandes escalas, esto suele ser un enorme reto a superar como por ejemplo, la dificultad para predecir la formación de agregados proteicos que llevan a las proteínas a incrustarse en cuerpos de inclusión (Palomares *et al.*, 2004).

En nuestro esquema de trabajo, el primer paso para la expresión de la ACCO era la elección del gen con el cual se va a trabajar. Propusimos la expresión de un gen de *A. thaliana* ya que los reportes previos no utilizan este organismo como fuente lo que nos permitía reducir la redundancia con investigaciones previas favoreciendo la elaboración de un modelo más generalizado de la catálisis de la ACCO. El gen elegido para la clonación y expresión fue aquel que dentro del genoma de *A. thaliana* presentó el mayor porcentaje de similitud con la secuencia de aminoácidos de dos de las ACCO mas estudiadas (*S. lycopersicum* y de *P. x hybrida*).

La utilización de diferentes técnicas moleculares nos permitió generar una construcción en la que la maquinaria del hospedero permitiera la expresión satisfactoria de la ACCO. Aunque establecer las condiciones de expresión de un sistema heterólogo puede un paso limitante en la producción de las proteínas (Palomares *et al.*, 2004), en este trabajo se logró encontrar las condiciones que favorecen la sobreexpresión de la ACCO mayoritariamente en la fase soluble. Con la finalidad de demostrar que la proteína producida fuera la ACCO se llevó a cabo una inmunodetección con anticuerpos anti-ACC de jitomate y de petunia que permitió confirmar su identidad.

Para la purificación de la ACCO comenzamos por modificar el amortiguador de extracción respecto a lo que se ha reportado en la literatura, decidimos que nuestro buffer de extracción no contendría EDTA. El EDTA es un inhibidor de la actividad de la ACCO ya que remueve el

hierro del sitio activo (Mitchell *et al.*, 1988) y diversos autores lo añaden al amortiguador como una forma de contender con la desactivación de la enzima, arguyendo la prevención de la catálisis. Sin embargo nosotros pensamos que dado que la desactivación de la ACCO sólo se observa en condiciones catalíticas, es decir, en presencia de todos los sustratos, la presencia del hierro en el sitio activo de la ACCO no debería de ser un problema si no se adiciona ACC. En *E. coli* no hay ACC sintasa y por lo tanto no hay ACC, así que no existe razón para pensar en que la proteína pudiera desactivarse antes de ser purificada. La utilización de EDTA conlleva la necesidad de adicionar hierro en exceso a la mezcla de reacción para reconstituir el sitio catalítico y así obtener una proteína activa (Dong *et al.*, 1992). Parte de nuestra hipótesis surge de esta contradicción, ya que en ausencia de EDTA deberíamos poder obtener una proteína cargada y, por lo tanto, activa.

Para el proceso de purificación de la ACCO se hicieron pruebas preliminares basándonos en los protocolos previamente descritos (Zhang *et al.*, 1995; Thrower *et al.*, 2001) y en el cálculo teórico del pI que encontramos cercano a pH 5. Los protocolos revisados utilizan un intercambiador iónico débil (DEAE) a pH 7.5 o uno fuerte (Q sefarosa) a pH 8. Al probarlos nosotros encontramos que ninguno de los dos nos permite la separación de la ACCO de las diferentes proteínas que se encontraban en la mezcla. Esto no es de sorprenderse debido a que los datos teóricos del pI suelen ser solamente indicativos por lo que el comportamiento con un intercambiador iónico puede variar considerablemente. Debido a que no existe información previa sobre la ACCO de *A. thaliana* decidimos montar un protocolo consistente en dos pasos con intercambiadores iónicos fuertes, uno catiónico y otro aniónico, y un paso de refinamiento por exclusión molecular que se describen en la sección anterior. Con estas modificaciones pudimos purificar la ACCO de *A. thaliana* recombinante con una pureza electroforética de alrededor de 90%. Este resultado nos permitió continuar con la caracterización bioquímica.

De manera paralela a la clonación y expresión, se trabajó con las metodologías para la estimación de actividad de ACCO. Se establecieron las diferentes condiciones para la medición de CN⁻ y etileno, así como la detección de ACC, utilizando diferentes estándares para validar la detección de cada uno de los productos o sustratos. De igual forma se ensayaron las mediciones de consumo de oxígeno con una lacasa para observar la capacidad del electrodo para detectar esta disminución.

Para establecer las condiciones de reacción de la ACCO se decidió utilizar el consumo de oxígeno, por ser la metodología más sencilla y con la que el curso de la reacción se puede

monitorear en tiempos cortos. Se comenzó con las mediciones de los diferentes controles, es decir, evaluar el consumo intrínseco de oxígeno del electrodo. Procedimos a leer el blanco de nuestra reacción que consistía de la mezcla de reacción sin el ACC, observamos que en esta mezcla existía una disminución de oxígeno. En la bibliografía se han descrito diferentes reacciones de oxidación del ácido ascórbico, de igual manera la necesidad de añadir hierro a la mezcla de reacción conlleva a la reacción de Fenton por lo que, la adición simultánea de hierro y ácido ascórbico puede causar la exacerbación de la reacción por la generación de radicales superóxido (Burkitt and Gilbert, 1990). Como se mencionó en la sección anterior, es posible observar una reacción de fondo con una tasa de consumo de oxígeno que dista del consumo basal del electrodo y que es dependiente de la concentración de los reactantes. Esta característica de dependencia de la concentración nos hace pensar que es producto de reacción química, como la que se describe de la auto-oxidación del ácido ascórbico posiblemente catalizada por la presencia de hierro en el medio (Buettner and Jurkiewicz, 1996). Ensayando diferentes relaciones molares de Hierro:Enzima pudimos establecer las condiciones de reacción en las que el fondo de la reacción química no opacara la reacción enzimática que presenta una cinética de saturación. La razón por la que la mejor condición se encuentra en una relación molar 2:1 Hierro:Enzima no la conocemos con certeza, pero podría deberse a la afinidad del sitio activo por el ion metálico. Es conocido que la afinidad por el hierro es baja en este tipo de enzimas (El Bakahli y Simaan, comunicación personal) por lo que una concentración mayor a una relación 1:1 ayudaría a que el equilibrio sea desplazado favoreciendo la formación del complejo Enzima-Fe.

Sin embargo, también fue posible detectar actividad enzimática en ausencia de hierro añadido, indicando que al menos una fracción de la ACCO en la mezcla se encuentra en la forma holo, es decir, cargada con hierro lo que valida nuestra hipótesis sobre la obtención de una proteína en su conformación nativa y activa. Adicionalmente deja claro que no es necesario el introducir EDTA al trabajar con la ACCO con lo que se previenen cambios en el plegamiento cercano al sitio activo por la abstracción del hierro.

Una vez establecidas las condiciones de reacción se intentó estimar la vida media de la actividad de ACCO utilizando mediciones de consumo de oxígeno. Tanto la actividad de la ACCO como su disminución durante el curso de la reacción fueron evidentes, sin embargo la estimación de la vida media no fue posible debido a la reacción de fondo. Otra limitante de esta

técnica parece ser la necesidad de proveer a la reacción de oxígeno adicional durante la medición ocasionando la imposibilidad de hacer repeticiones confiables.

En forma paralela se procedió a la detección de CN^- de tal forma que se confirmaran los resultados obtenidos con el consumo de oxígeno. La ausencia de cianuro en la muestra control (sin la adición de ACC) es un buen indicador de la actividad de la ACCO, indicando que la producción de CN^- es dependiente de ACC. Hasta este punto teníamos ya dos evidencias de la actividad de nuestra enzima recombinante. Es importante resaltar que la medición de CN^- utilizada dista de la que se utiliza para establecer la estequiometría de la reacción, anteriormente ésta no se realizó en solución sino que el HCN formado se adsorbió en una matriz para después proceder a su determinación, lo cual genera datos ambiguos de la concentración de producto generado (Dong *et al.*, 1992).

Otra forma de evaluar la actividad de la ACCO es estimando el porcentaje de consumo de ACC. Para esta metodología se realizaron mediciones del aminoácido restante una vez ocurrida la reacción, para tal efecto la mezcla de reacción se dejó incubar a 25° C y se tomaron alícuotas a diferentes tiempos, el ACC remanente fue derivatizado utilizando PITC. El cambio en la señal a 254nm se monitoreó para evaluar el consumo de ACC en los diferentes tiempos. Una vez realizadas las mediciones no se observa una disminución relativa de la concentración de ACC en los tiempos monitoreados. Aparentemente la mezcla de reacción y los productos generados por la catálisis enzimática podrían estar reaccionando con el PITC y alterando la señal en el HPLC (Bushey *et al.*, 1987).

La detección de etileno como producto de la reacción es de suma importancia para la caracterización de la ACCO. Nuestros resultados indican que la producción de etileno por la ACCO de *A. thaliana* es dependiente de ACC, de ácido ascórbico y de bicarbonato, en concordancia con el mecanismo de reacción vigente a la fecha. Sin embargo, muestran una actividad específica varios órdenes de magnitud menor a la observada con la enzima proveniente de *P. x. hybrida*. Esta diferencia no la podemos explicar con los datos obtenidos hasta el momento pero podría ser intrínseca de la proteína elegida como modelo.

También demostramos que la producción de etileno es independiente de la adición de hierro al medio de reacción, lo que tomamos como evidencia de que la enzima en la preparación obtenida se encuentra, por lo menos en una fracción en su forma holo. La obtención de holoenzimas asegura que a los fenómenos estudiados no se vean alterados por la adición de concentraciones elevadas de hierro que interfieran con la mezcla al generarse la

reacción de Fenton. El poder eliminar una de las variables en un sistema tan complejo como lo es la catálisis de la ACCO sin duda permitirá ayudar a la correcta elucidación de los pasos que aún permanecen como una incógnita.

Los datos de producción de CN^- una vez comparados con la cantidad de etileno obtenida en las reacciones no corresponden con lo que la estequiometría dicta, es decir 1 a 1. Al contrario, nuestros resultados muestran que la generación de CN^- parece ser al menos un orden de magnitud mayor que la de etileno, sin embargo debido a la naturaleza de la prueba para el CN^- no es posible hacer una estimación exacta. Esto nos lleva a concluir que debemos establecer un protocolo que permita la identificación del CN^- de forma precisa y comparar así las diferentes ACCO que se utilizan como modelo. De igual manera soporta la idea de la necesidad de revisión del mecanismo catalítico propuesto, sumándose a la serie de inconsistencias del ciclo catalítico mencionadas a lo largo de este documento. Más aún, un cambio en la estequiometría de la reacción hace forzosa la revisión del mecanismo catalítico. Nuestras observaciones son preliminares, pero consistentes en enzimas de tres diferentes fuentes: *A. thaliana*, jitomate y petunia (El Bakahli y Simaan, comunicación personal). Por ahora no es posible concluir en materia de estequiometría sin embargo sabemos que la ACCO que obtuvimos presenta un comportamiento similar al de otras ACCOs. La obtención de nuestra enzima de una forma nativa ayuda a que podamos atribuir nuestras observaciones a la actividad de la ACCO y no a algún artificio causado al intentar reconstituir el sitio activo de la proteína. El que la obtención de ambos productos se observe sin la adición de hierro a la mezcla de reacción es un aliciente para seguir con este protocolo de purificación.

Conclusiones

En este trabajo se logró la clonación expresión y purificación de una ACCO proveniente de *A. thaliana* que presenta un elevado porcentaje de similitud con otras ACCO previamente purificadas.

Se establecieron las condiciones para las diferentes metodologías para la medición de la actividad de la ACCO.

Demostramos que es posible obtener una ACCO activa con el centro metálico si se evita ponerla en presencia de algún agente quelante durante la purificación. La revisión del mecanismo catalítico de la ACCO se hace necesaria al observar una estequiometría modificada de lo establecido.

Perspectivas

Distinto a la simplicidad que la producción heteróloga de una proteína parece hoy en día, la obtención de ésta puede resultar más difícil de lo esperado. De igual manera su obtención enmarca una serie de posibilidades futuras en las que el límite suele ser el ingenio de los investigadores. La expresión heteróloga y purificación de la ACCO de *A. thaliana* permite explorar la bioquímica de la proteína e inclusive llevarla a un nivel de aplicación biotecnológica. Una vez establecidos los protocolos para la expresión, purificación y medición de la actividad se puede proponer una estrategia que eleve la producción.

Un análisis más detallado de la ACCO puede surgir si nos enfocamos en un producto diferente al que se mide habitualmente. Proponemos que la medición de CN^- podría ayudar a a una mejor caracterización de la ACCO, principalmente por sus características de solubilidad. Hasta ahora se han reportado diferentes metodologías que permiten la evaluación de CN^- , cabe resaltar el trabajo de Kaur *et al.* en donde proponen un método simple de detección colorimétrica de CN^- basada en la formación de un aducto con un colorante derivado de trietilmetano (Kaur *et al.*, 2009). Utilizando técnicas sensibles que permitan la cuantificación del CN^- elimina el manejo de los gases y por lo tanto facilita la obtención de resultados más confiables, esto es, no depende de un sistema hermético en el que la pérdida de producto gaseoso sea incierta.

En lo que respecta al análisis del etileno la utilización de otros detectores en cromatografía de gases podría ayudar a mejorar la señal obtenida, se sabe que el detector de fotoionización (PID) es más selectivo que el FID (Abeles *et al.*, 1992), por lo que la utilización de este sistema se recomienda para la obtención de datos con mayor precisión. Por la parte de consumo de ACC se han reportado ensayos que parecen ser muy sensibles para la medición de éste utilizando principalmente técnicas de HPLC, sin embargo habría que establecer su utilizad en las condiciones de reacción de la ACCO y en presencia de los reactivos necesarios para la catálisis (Lizada and Yang, 1979; Bushey *et al.*, 1987).

La obtención de las constantes catalíticas es necesaria para la adecuada caracterización de la ACCO, aquí la necesidad de pruebas para medir la actividad que sean precisas y dejando de lado las ambigüedades que se han discutido a lo largo del texto. De igual manera se recomienda la utilización de diferentes inhibidores de la actividad de la ACCO, así como competidores competitivos y no competitivos para la generación de cinéticas de estado estacionario ayudarían al esclarecimiento de la entrada de los diferentes sustratos.

Este trabajo permite explorar un sinfín de posibilidades en cuanto a caracterización bioquímica de la ACCO, como también la posibilidad de trabajos futuros de ingeniería de proteínas redox ya que la modificación racional de la reactividad del centro metálico y/o la estabilidad de la proteína son herramientas de interés industrial (Kovaleva and Lipscomb, 2008). Actualmente el etileno proviene de la industria petroquímica mediante procesos de craqueo de fracciones pesadas que involucran temperaturas elevadas que oscilan los 900 ° C y diferentes pasos de destilación. La síntesis enzimática de etileno generaría una opción en la industria blanca, disminuyendo la energía requerida y los pasos para su obtención. Actualmente el etileno en la sociedad representa un papel preponderante en la producción de óxido de etileno, bicloruro de etileno, polietileno y otros polímeros. La obtención de un biocatalizador estable está sujeta al conocimiento de sus mecanismos catalíticos y de aquellos mecanismos que la hacen vulnerables, es decir, el mecanismo de desactivación. Sin embargo, esto no podría ser si no se tiene un sistema de expresión y una metodología que permita la purificación y análisis de la ACCO.

Referencias

- Abeles, F.B., Morgan, P.W., and Saltveit, M.E. (1992). Ethylene Analysis and Properties of the Gas. In: Ethylene in Plant Biology Sn. Diego, Cal.: Academic Press Inc., 14-55.
- Adams, D.O. and Yang, S.F. (1979). Ethylene biosynthesis: Identification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *76*, 170-174.
- Andreini, C., Bertini, I., Cavallaro, G., Najmanovich, R.J., and Thornton, J.M. (2009). Structural analysis of metal sites in proteins: non-heme iron sites as a case study. *J. Mol. Biol.* *388*, 356-380.
- Baker, H.M., Anderson, B.F., and Baker, E.N. (2003). Dealing with iron: common structural principles in proteins that transport iron and heme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *100*, 3579-3583.
- Bassan, A., Borowski, T., Schofield, C.J., and Siegbahn, P.E. (2006). Ethylene biosynthesis by 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase: a DFT study. *Chemistry*. *12*, 8835-8846.
- Berlett, B.S. and Stadtman, E.R. (1997). Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J. Biol. Chem.* *272*, 20313-20316.
- Bleecker, A.B. and Kende, H. (2000). Ethylene: a gaseous signal molecule in plants. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *16*, 1-18.
- Bruijninx, P.C., van, K.G., and Klein Gebbink, R.J. (2008). Mononuclear non-heme iron enzymes with the 2-His-1-carboxylate facial triad: recent developments in enzymology and modeling studies. *Chem. Soc. Rev.* *37*, 2716-2744.
- Brunhuber, N.M., Mort, J.L., Christoffersen, R.E., and Reich, N.O. (2000). Steady-state kinetic mechanism of recombinant avocado ACC oxidase: initial velocity and inhibitor studies. *Biochemistry* *39*, 10730-10738.
- bu-Omar, M.M., Loaiza, A., and Hontzeas, N. (2005). Reaction mechanisms of mononuclear non-heme iron oxygenases. *Chem. Rev.* *105*, 2227-2252.
- Buettner, G.R. and Jurkiewicz, B.A. (1996). Catalytic metals, ascorbate and free radicals: combinations to avoid. *Radiat. Res.* *145*, 532-541.
- Burkitt, M.J. and Gilbert, B.C. (1990). Model studies of the iron-catalysed Haber-Weiss cycle and the ascorbate-driven Fenton reaction. *Free Radic. Res. Commun.* *10*, 265-280.
- Bushey, D.F., Law, D.M., and Davies, P.J. (1987). High-performance liquid chromatography analysis of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid using o-phthalaldehyde precolumn derivatization. *Anal. Biochem.* *167*, 31-36.

Carr,A. and Frei,B. (1999). Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions? *FASEB J.* *13*, 1007-1024.

Chen,Y.F., Etheridge,N., and Schaller,G.E. (2005). Ethylene signal transduction. *Ann. Bot. (Lond)* *95*, 901-915.

Chuan Xu,Z., Hyodo,H., Ikoma,Y., Yano,M., and Ogawa,K. (1998). Biochemical characterization and expression of recombinant ACC oxidase in *Escherichia coli* and endogenous ACC oxidase from kiwifruit. *Postharvest Biology and Technology* *14*, 41-50.

Chung,C.T., Niemela,S.L., and Miller,R.H. (1989). One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *86*, 2172-2175.

Costas,M., Mehn,M.P., Jensen,M.P., and Que,L., Jr. (2004). Dioxygen activation at mononuclear nonheme iron active sites: enzymes, models, and intermediates. *Chem. Rev.* *104*, 939-986.

Crichton,R.R. (2008). *Biological Inorganic Chemistry: An Introduction*, Amsterdam.

Crichton,R.R. and Pierre,J.L. (2001). Old iron, young copper: from Mars to Venus. *Biometals* *14*, 99-112.

Davies,M.J. (2005). The oxidative environment and protein damage. *Biochim. Biophys. Acta* *1703*, 93-109.

Decker,A. and Solomon,E.I. (2005). Dioxygen activation by copper, heme and non-heme iron enzymes: comparison of electronic structures and reactivities. *Curr. Opin. Chem. Biol.* *9*, 152-163.

Degtyarenko,K. (2000). Bioinorganic motifs: towards functional classification of metalloproteins. *Bioinformatics.* *16*, 851-864.

Dokmanic,I., Sikic,M., and Tomic,S. (2008). Metals in proteins: correlation between the metal-ion type, coordination number and the amino-acid residues involved in the coordination. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* *64*, 257-263.

Dong,J.G., Fernandez-Maculet,J.C., and Yang,S.F. (1992). Purification and characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase from apple fruit. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *89*, 9789-9793.

Etheridge,N., Chen,Y.F., and Schaller,G.E. (2005). Dissecting the ethylene pathway of *Arabidopsis*. *Brief. Funct. Genomic. Proteomic.* *3*, 372-381.

Farr,S.B. and Kogoma,T. (1991). Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Microbiol. Rev.* *55*, 561-585.

Fernandez-Maculet,J.C., Dong,J.G., and Yang,S.F. (1993). Activation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase by carbon dioxide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *193*, 1168-1173.

Halliwell,B. and Gutteridge,J.M. (1984). Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* *219*, 1-14.

Hamilton,A.J., Bouzayen,M., and Grierson,D. (1991). Identification of a tomato gene for the ethylene-forming enzyme by expression in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *88*, 7434-7437.

Hansberg,W. (2002). Biología de las Especies de Oxígeno Reactivas. *Mensaje Bioquímico XXVI*, 19-54.

Hawkins,C.L. and Davies,M.J. (2001). Generation and propagation of radical reactions on proteins. *Biochim. Biophys. Acta* *1504*, 196-219.

Holm,R.H., Kennepohl,P., and Solomon,E.I. (1996). Structural and Functional Aspects of Metal Sites in Biology. *Chem. Rev.* *96*, 2239-2314.

Kaur,P., Sareen,D., Kaur,S., and Singh,K. (2009). An efficacious "naked-eye" selective sensing of cyanide from aqueous solutions using a triarylmethane leuconitrile. *Inorganic Chemistry Communications* *12*, 272-275.

Kende,H. (1993). Ethylene Biosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* *44*, 283-307.

Klinman,J.P. (2001). Life as aerobes: are there simple rules for activation of dioxygen by enzymes? *J. Biol. Inorg. Chem.* *6*, 1-13.

Klinman,J.P. (2007). How Do Enzymes Activate Oxygen without Inactivating Themselves? *Acc. Chem. Res.* *40*, 325-333.

Koehntop,K.D., Emerson,J.P., and Que,L., Jr. (2005). The 2-His-1-carboxylate facial triad: a versatile platform for dioxygen activation by mononuclear non-heme iron(II) enzymes. *J. Biol. Inorg. Chem.* *10*, 87-93.

Konigsberg Fainstein,M. (2008). Radicales Libres y Estres Oxidativo: Aplicaciones Medicas, México: Manual Moderno.

Kovaleva,E.G. and Lipscomb,J.D. (2008). Versatility of biological non-heme Fe(II) centers in oxygen activation reactions. *Nat. Chem. Biol.* *4*, 186-193.

Lay,V.J., Prescott,A.G., Thomas,P.G., and John,P. (1996). Heterologous expression and site-directed mutagenesis of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase from kiwi fruit. *Eur. J. Biochem.* *242*, 228-234.

Li,N., Jiang,X.N., Cai,G.P., and Yang,S.F. (1996). A novel bifunctional fusion enzyme catalyzing ethylene synthesis via 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. *J. Biol. Chem.* *271*, 25738-25741.

Lizada,M.C. and Yang,S.F. (1979). A simple and sensitive assay for 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. *Anal. Biochem.* *100*, 140-145.

Meyerowitz,E.M. (2001). Prehistory and history of Arabidopsis research. *Plant Physiol* *125*, 15-19.

- Mirica,L.M. and Klinman,J.P. (2008). The nature of O₂ activation by the ethylene-forming enzyme 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *105*, 1814-1819.
- Mirica,L.M., McCusker,K.P., Munos,J.W., Liu,H.W., and Klinman,J.P. (2008). ¹⁸O kinetic isotope effects in non-heme iron enzymes: probing the nature of Fe/O₂ intermediates. *J. Am. Chem. Soc.* *130*, 8122-8123.
- Mitchell,T., Porter,A.J.R., and John,P. (1988). Authentic activity of the ethylene-forming enzyme observed in membranes obtained from kiwifruit (*Actinidia deliciosa*). *New Phytol* *109*, 313-319.
- Palomares,L.A., Estrada-Mondaca,S., and Ramirez,O.T. (2004). Production of recombinant proteins: challenges and solutions. *Methods Mol. Biol.* *267*, 15-52.
- Pau,M.Y., Lipscomb,J.D., and Solomon,E.I. (2007). Substrate activation for O₂ reactions by oxidized metal centers in biology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *104*, 18355-18362.
- Prescott,A.G. and John,P. (1996). DIOXYGENASES: Molecular Structure and Role in Plant Metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol Plant Mol. Biol.* *47*, 245-271.
- Rocklin,A.M., Kato,K., Liu,H.W., Que,L., Jr., and Lipscomb,J.D. (2004). Mechanistic studies of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase: single turnover reaction. *J. Biol. Inorg. Chem.* *9*, 171-182.
- Ryle,M.J. and Hausinger,R.P. (2002). Non-heme iron oxygenases. *Curr. Opin. Chem. Biol.* *6*, 193-201.
- Sawyer,D.T. (1991). *Oxygen Chemistry*, New York.
- Scarpa,M., Stevanato,R., Viglino,P., and Rigo,A. (1983). Superoxide ion as active intermediate in the autoxidation of ascorbate by molecular oxygen. Effect of superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* *258*, 6695-6697.
- Seki,M., Carninci,P., Nishiyama,Y., Hayashizaki,Y., and Shinozaki,K. (1998). High-efficiency cloning of Arabidopsis full-length cDNA by biotinylated CAP trapper. *Plant Journal* *15*, 707-720.
- Seki,M. *et al.* (2002). Functional annotation of a full-length Arabidopsis cDNA collection. *Science* *296*, 141-145.
- Shaw,J.F., Chou,Y.S., Chang,R.C., and Yang,S.F. (1996). Characterization of the Ferrous Ion Binding Sites of Apple 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate Oxidase by Site-Directed Mutagenesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* *225*, 697-700.
- Soares A.L. and Mello-Farias P.C. (2006). Ethylene and fruit ripening: From illumination gas to the control of gene expression, more than a century of discoveries. *Genetics and Molecular Biology* *29*, 508-512.
- Solomon,E.I., Brunold,T.C., Davis,M.I., Kemsley,J.N., Lee,S.K., Lehnert,N., Neese,F., Skulan,A.J., Yang,Y.S., and Zhou,J. (2000). Geometric and electronic structure/function correlations in non-heme iron enzymes. *Chem. Rev.* *100*, 235-350.

Tayeh,M.A., Howe,D.L., Salleh,H.M., Sheflyan,G.Y., Son,J.K., and Woodard,R.W. (1999). Kinetic and mutagenic evidence for the role of histidine residues in the *Lycopersicon esculentum* 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase. *J. Protein Chem.* *18*, 55-68.

Thrower,J., Mirica,L.M., McCusker,K.P., and Klinman,J.P. (2006). Mechanistic investigations of 1-aminocyclopropane 1-carboxylic acid oxidase with alternate cyclic and acyclic substrates. *Biochemistry* *45*, 13108-13117.

Thrower,J.S., Blalock,R., III, and Klinman,J.P. (2001). Steady-state kinetics of substrate binding and iron release in tomato ACC oxidase. *Biochemistry* *40*, 9717-9724.

Tyagi,R., Lai,R., and Duggleby,R.G. (2004). A new approach to 'megaprimer' polymerase chain reaction mutagenesis without an intermediate gel purification step. *BMC. Biotechnol.* *4*, 2.

Valderrama,B., Ayala,M., and Vazquez-Duhalt,R. (2002). Suicide inactivation of peroxidases and the challenge of engineering more robust enzymes. *Chem. Biol.* *9*, 555-565.

Valderrama,B., Paredes,G., Gil-Rodriguez,P., Ruíz,D., and Gasteazoro,F. SELF-INFLICTED OXIDATIVE DAMAGE OF REDOX METALLOPROTEINS. Third Workshop in Comparative Aspects of Oxidative Stress in Biological Systems . 2007.

Ref Type: Conference Proceeding

Vallee,B.L. and Williams,R.J.P. (1968). Metalloenzymes: The Entatic Nature of Their Active Sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *59*, 498-505.

Wang,K.L., Li,H., and Ecker,J.R. (2002). Ethylene biosynthesis and signaling networks. *Plant Cell* *14 Suppl*, S131-S151.

Williams,R.J.P. and Frausto da Silva,J.J. (2004). The Trinity of Life: The Genome, the Proteome, and the Mineral Chemical Elements. *Journal of Chemical Education* *81*, 738-749.

Zhang,Z., Ren,J.S., Clifton,I.J., and Schofield,C.J. (2004). Crystal structure and mechanistic implications of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase--the ethylene-forming enzyme. *Chem. Biol.* *11*, 1383-1394.

Zhang,Z., Schofield,C.J., Baldwin,J.E., Thomas,P., and John,P. (1995). Expression, purification and characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase from tomato in *Escherichia coli*. *Biochem. J.* *307 (Pt 1)*, 77-85.

Zhou,J., Rocklin,A.M., Lipscomb,J.D., Que,L., Jr., and Solomon,E.I. (2002). Spectroscopic studies of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase: molecular mechanism and CO(2) activation in the biosynthesis of ethylene. *J. Am. Chem. Soc.* *124*, 4602-4609.