

**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

“Expresión heteróloga y análisis funcional de una
asparaginasa proveniente del arqueón
Thermoplasma acidophilum”

Tesis que presenta

María Guadalupe Serna Domínguez

Para obtener el grado de

Maestro(a) en Ciencias en Biología Molecular

Director de Tesis:

Dra. Martha Leticia Santos Martínez

San Luis Potosí, S.L.P., Julio de 2012



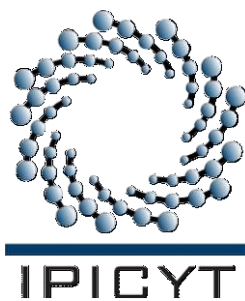
Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**Expresión heteróloga y análisis funcional de una asparaginasa proveniente del arqueón *Thermoplasma acidophilum***” presentada para obtener el Grado de de Maestro(a) en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **María Guadalupe Serna Domínguez** y aprobada el **de Julio de 2012** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dra. Martha Leticia Santos Martínez
(Director de tesis)

Dra. Rubén H. López Revilla
(Miembro del Comité Tutoral)

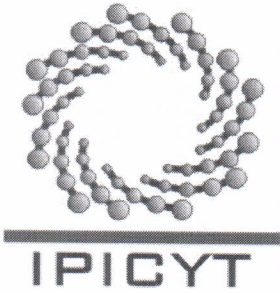
Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa
(Miembro del Comité Tutoral)



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Biotecnología Molecular de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección de la Dra. Martha Leticia Santos Martínez.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. de registro 250294) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.



Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 101 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 10 días del mes de julio del año 2012, se reunió a las 12:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Rubén Hipólito López Revilla	Presidente	IPICYT
Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa	Secretaria	IPICYT
Dra. Martha Leticia Santos Martínez	Sinodal	IPICYT

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó la C.

María Guadalupe Serna Domínguez

sobre la Tesis intitulada:

*Expresión heteróloga y análisis funcional de una asparaginasa proveniente del arqueón **Thermoplasma acidophilum***

que se desarrolló bajo la dirección de

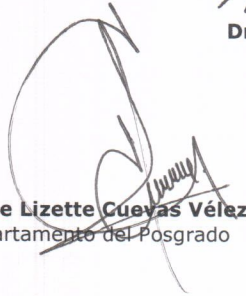
Dra. Martha Leticia Santos Martínez

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 13:00 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 10 días del mes de julio de 2012.



Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado



Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico



Dedicatorias

A Dios y a la vida por permitirme concluir esta etapa de crecimiento.

A mis padres por ser ejemplo de lucha y dedicación.

A mi familia por brindarme el apoyo y cariño necesario, por creer en mí, en mis sueños y alentarme en seguir adelante.

A mi abuela Consuelo Veloz[†] que ya no se encuentra con nosotros y a mi hermana Imelda[†] quién es mi pequeño ángel.

A mis verdaderos amigos quienes son parte esencial en mi vida, gracias por brindarme su apoyo y amistad incondicional.

A las personas que me acompañaron en esta etapa de mi vida y ahora forman parte de mí.

A todas aquellas personas que me permitieron crecer como persona a nivel profesional y sobretodo personal.

Agradecimientos

A la Dra. Leticia Santos Martínez por permitirme realizar este trabajo.

Al Dr. Rubén López Revilla y a la Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa por el tiempo invertido en la revisión de tesis y comentarios otorgados.

A la Dra. Gabriela Margarita Montero Moran por su asesoría.

Al M.C. Gabriel Ordoñez Acevedo por su apoyo y consejos técnicos.

A mis amigos Joshua Eduardo Esparza, Criseida Villalobos y Marizel Astello por sus comentarios, consejos, experiencias y enseñanzas.

Al IPICyT por ser una institución determinante en mi vida, así como el apoyo para la realización de mis estudios.

Al LANBAMA y a la L.P. Verónica Zárate Chávez por el equipo y asesoría técnica.

A CONACyT por la beca de Maestría en Ciencias (250294)

Contenido

Constancia de aprobación de tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Acta de examen	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Lista de tablas	ix
Lista de figuras	x
Lista de anexos	xi
Resumen	1
Abstract	2
1. Introducción	3
1.1 Historia de las asparaginasas	3
1.2 Aplicaciones y usos de las asparaginasas	3
1.2.1 Utilización de la asparaginasa como agente antitumoral	3
1.2.2 Mecanismo de acción de la asparaginasa en células leucémicas	4
1.2.3 Papel de la asparaginasa en la industria alimentaria	5
1.2.4 La asparagina y el ácido aspártico en los organismos	6
1.3 Asparaginasas y su clasificación	6
1.4 Asparaginasas tipo planta, clasificación y distribución	7
1.5 <i>Thermoplasma acidophilum</i>	10
2. Materiales y métodos	11
2.1 Análisis bioinformático	11

2.2	Diseño de oligonucleótidos, amplificación y clonación del gen <i>Ta0338</i>	11
2.3	Vector de expresión pET28a(+)	12
2.3.1	Digestión con las enzimas de restricción <i>NcoI</i> y <i>XhoI</i>	13
2.3.2	Ligación	13
2.3.3	Transformación	13
2.3.4	Minipreparaciones	14
2.4	Expresión de la construcción pET28a(+)/ <i>Ta0338</i>	15
2.5	Purificación en condiciones nativas	15
2.5.1	Cromatografía de afinidad a níquel (Ni-NTA)	16
2.6	Cuantificación de proteína	16
2.7	Determinación de proteína	16
2.8	Procesamiento <i>in vitro</i>	17
2.9	Determinación de la actividad enzimática	17
3.	Resultados y discusión	19
3.1	Análisis bioinformático	19
3.2	Clonación del gen <i>Ta0338</i> en el vector de expresión pET28a(+)	21
3.3	Expresión, purificación y análisis de inmunoblot de la proteína recombinante	21
3.4	Procesamiento autocatalítico <i>in vitro</i>	23
3.5	Determinación de la actividad enzimática	27
4.	Conclusiones	30
5.	Perspectivas de trabajo	30
6.	Referencias	31
7.	Anexos	35

Lista de tablas

1	Asparaginásas comerciales y su tiempo medio de vida.	4
2	Oligonucleótidos específicos para la amplificación del gen <i>Ta0338</i> y clonación en el vector de expresión pET28a(+)	12
3	Porcentaje de identidad de aminoácidos de la secuencia de la asparaginasa de <i>T. acidophilum</i> respecto a algunas asparaginásas tipo planta caracterizadas	20

Lista de figuras

1	Modelo de sensibilidad de las células leucémicas a la asparaginasa en médula ósea	5
2	Alineación múltiple de secuencias de: la aspartilglucosaminidasa de <i>Flavobacterium meningosepticum</i> y asparaginasa tipo planta de <i>Escherichia coli</i> , <i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>Anabaena</i> sp. y <i>Synechocystis</i> sp.	8
3	Modelo general del procesamiento intramolecular autocatalítico de las Ntn-hidrolasas	9
4	Alineación tipo ClustalW2 de secuencias de amino ácidos de la asparaginasa de <i>T. acidophilum</i> y asparaginasa tipo planta	20
5	Clonación del gen <i>Ta0338</i> en el vector de expresión pET28a(+)	22
6	Expresión, purificación y análisis de inmunoblot de la asparaginasa recombinante	24
7	Procesamiento autocatalítico <i>in vitro</i> de la asparaginasa recombinante a 37°C y 4°C	26
8	Cinética del procesamiento autocatalítico <i>in vitro</i> de la asparaginasa de <i>T. acidophilum</i>	26
9	Evaluación del grado de procesamiento autocatalítico <i>in vitro</i> de la enzima recombinante	29
10	Cinética de la actividad enzimática de la asparaginasa tipo planta de <i>T. acidophilum</i>	29

Anexos

1	Extracción de DNA genómico de <i>Thermoplasma acidophilum</i>	35
2	Purificación del producto de PCR (kit purificación Qiagen)	37
3	Geles de agarosa al 1%	37
4	Purificación de gel (kit de purificación Qiagen)	38
5	Células calcio competentes	39
6	Composición del medio Luria Bertani (LB) Invitrogen	41
7	Antibióticos de selección	41
8	PCR de colonia	41
9	Minipreparaciones por kit Qiaprep (purificación de DNA plasmídico)	42
10	Almacenamiento de células con glicerol 15%	43
11	Electroforesis de proteínas	44
12	Tinción de Coomassie coloidal al 0.06%	48
13	Western blot	49
14	Purificación por cromatografía de afinidad por níquel (Ni-NTA)	54
15	Cuantificación de proteínas por el método de Bradford	56
16	Ensayo enzimático NADH-acoplado para medir actividad asparaginasa	58

Resumen

“Expresión heteróloga y análisis funcional de una asparaginasa proveniente del arqueón *Thermoplasma acidophilum*”

Las asparaginastas (amidohidrolasas EC 3.5.1.1) son enzimas que catalizan la hidrólisis de L-asparagina hacia ácido aspártico y amonio, han adquirido importancia por su efecto antineoplásico en el tratamiento de la Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA), así como en la industria alimentaria ya que reducen la formación de acrilamida en los alimentos. Enzimas con actividad asparaginasa se clasifican en dos grandes grupos: las tipo bacteriano y las tipo planta. *Thermoplasma acidophilum* es un arqueón extremófilo que cuenta con un marco de lectura abierta (*orf* por sus siglas en inglés) *Ta0338* que codifica una asparaginasa cuyo análisis bioinformático la clasificó dentro de las asparaginastas tipo planta y de la superfamilia de las Ntn-hidrolasas. En este trabajo, el *orf Ta0338* se amplificó del genoma de *T. acidophilum* y se clonó en el vector de expresión pET28a(+). La proteína recombinante se expresó en la cepa de *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS a 37°C y se purificó por cromatografía de afinidad a níquel con una producción de 9.68 mg/L. Esta proteína mostró un proceso autocatalítico donde el zimógeno de ~32 kDa se autohidroliza generando la subunidad alfa de ~18 kDa y la beta de ~13 kDa. Análisis de electroforesis en condiciones nativas evidenció un complejo heterotetramérico de ~64 kDa, sugiriendo el arreglo típico de las Ntn-hidrolasas ($\alpha\beta\beta\alpha$). Datos preliminares revelan la capacidad de la enzima de hidrolizar L-asparagina.

Palabras clave: *Archaea*, asparaginasa, Ntn-hidrolasas, Leucemia, asparaginasa tipo planta, *Thermoplasma acidophilum*.

Abstract

Heterologous expression and functional analysis of an asparaginase from the archaeon *Thermoplasma acidophilum*

L-asparaginases (EC 3.5.1.1) are enzymes that catalyze the hydrolysis of L-asparagine to L-aspartate and ammonium; they have a key pharmacological effect as antineoplastic agent on Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) and the decrease of acrylamide formation in industrial food processing. Here we present the characterization of the first plant-type asparaginase from the archaeon *Thermoplasma acidophilum*. The *Ta0338 orf* from *T. acidophilum* was amplified and cloned into the pET28a(+) expression vector. The recombinant protein was expressed in *Escherichia coli* strain BL21(DE3)pLysS at 37°C and purified by Ni-NTA affinity chromatography with a yield of approximately 9.68 mg/L. This protein shows an autocatalytic process of the zymogen, producing the expected alpha and beta subunits. Native electrophoresis analysis demonstrates a multimeric complex with an approximate molecular weight of 64 kDa, which resembles to the typical heterotetrameric arrangement of Ntn-hydrolases ($\alpha\beta\beta\alpha$). Preliminary data show that the recombinant asparaginase is able to hydrolyze L-asn.

Key words: *Archaea*, asparaginase, Ntn-hydrolases, Leukemia, plant-type asparaginase, *Thermoplasma acidophilum*.

1. Introducción

1.1 Historia de las asparaginasas

La hidrólisis enzimática de la asparagina (L-asn) en ácido aspártico (L-asp) y amonio (NH_4) llevada a cabo por la asparaginasa, se detectó por primera vez en 1904 por Lang, quién señaló su presencia en algunos tejidos de bovinos [1]. Por otro lado en 1922, Clementi concluyó que la asparaginasa era activa en prácticamente todos los tejidos de animales herbívoros, en el hígado de animales omnívoros y ausente en animales carnívoros, anfibios y reptiles [1]. En 1961, Broome atribuye las propiedades antitumorales del suero de cobayo a la actividad asparaginasa e introduce tal actividad para el tratamiento de la Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) [2].

1.2 Aplicaciones y usos de las asparaginasas

1.2.1 Utilización de la asparaginasa como agente antitumoral

La LLA es una neoplasia maligna que afecta a los precursores de los linfocitos en la médula ósea; es un tipo frecuente de cáncer en niños de entre 2-5 años de edad. El protocolo de tratamiento contra este tipo de leucemia es muy complejo debido al sinnúmero de fármacos que se administran. No obstante el éxito de supervivencia es aproximado al 85% de los casos tratados, aunque la tasa de

decesos alcanza hasta un 15% anual [3, 4]. Últimamente, ha mejorado considerablemente el índice de supervivencia debido al uso de distintos agentes quimioterapéuticos, entre los cuales destacan las asparaginasa tipo bacteriano procedentes de *Escherichia coli*, y *Erwinia chrysanthemi* [5, 6] (Tabla 1).

Tabla 1. Asparaginasa comerciales y su tiempo medio de vida en plasma. Modificado [4].

Producto	Fuente	Tiempo de vida media (T_{1/2})
<i>E. coli</i> Native (ASnase)	Mercker & Co. Inc.	1.28 días
PEG-ASnase (ONCOSPAR®)	Enzol Pharmaceuticals	5.3 días
Erwinase (Native ASnase)	Speywood Pharmaceuticals	0.65 días

1.2.2 Mecanismo de acción de las asparaginasa en células leucémicas

Las células leucémicas tienen comprometida la habilidad de generar L-asn endógena debido a la baja expresión de asparagina sintasa (AS) [4, 7, 8] y/o a las insuficientes cantidades de sustrato (L-asparagina y L-aspartato) [9], por lo que necesitan de un gran acervo de asparagina exógena para poder proliferar. Sin embargo al depletar la L-asn circulante en plasma por la actividad asparaginasa, se priva la incorporación de este aminoácido a las células leucémicas llevándolas hacia apoptosis, lo que resulta en una disminución en el crecimiento tumoral (fig. 1.) [4, 8].

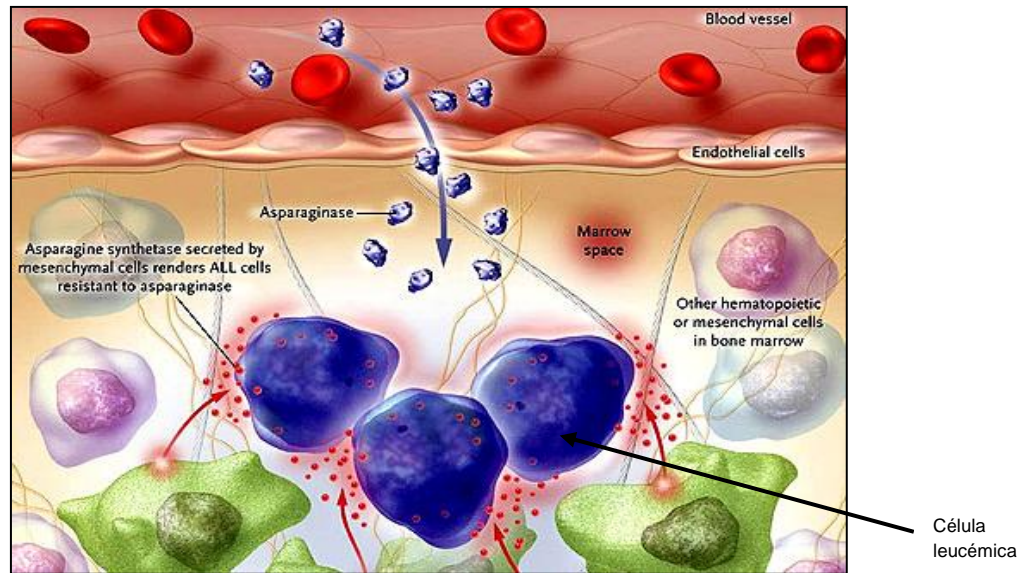


Figura 1. Modelo de sensibilidad de las células leucémicas a la asparaginasa en médula ósea. Modificado de [10].

1.2.3 Papel de la asparaginasa en la industria alimentaria

Desde la década pasada, la presencia de altos niveles de acrilamida en muchos alimentos comunes ha causado un gran debate e interés, ya que es un potente agente carcinogénico para humanos y podría ser de alto riesgo a través de su exposición diaria. Por lo anterior se han buscado y utilizado una gran variedad de métodos para reducir los niveles de formación del compuesto orgánico.

Recientemente, la industria alimentaria se ha visto beneficiada con el uso de la asparaginasa, ya que resulta ser un excelente agente reductor en la formación de acrilamida en los alimentos, debido a que degrada la L-asn. La vía predominante para la formación de este potente agente carcinogénico es a través de la reacción

de Maillard, dada entre el aminoácido asparagina (L-asn) y los azúcares reductores del medio, a una temperatura típica por arriba de los 100°C. Esta reacción es responsable del color y sabor de los alimentos fritos y/o cocidos [11].

1.2.4 La asparagina y el ácido aspártico en los organismos

La asparagina (L-asn) y el ácido aspártico (L-asp) juegan papeles muy importantes en todos los organismos vivos, siendo participes en un cierto número de procesos metabólicos. En plantas, la L-asn es el metabolito más abundante para almacén y transporte de N_2 , el cual se utiliza para la biosíntesis de proteínas. En humanos, el L-asp participa como precursor de la ornitina en el ciclo de la urea y también en las reacciones de transaminación que forman el oxalacetato en la ruta de la gluconeogénesis [13].

1.3 Asparaginasas y su clasificación

Las asparaginasas (EC 3.5.1.1) son amidohidrolasas que catalizan la hidrólisis de L-asn (L-asparagina) hacia ácido aspártico (L-asp) y amonio (NH_4^+). Las enzimas con actividad asparaginasa son clasificadas en dos grandes grupos: las asparaginasas tipo bacteriano y las tipo planta. Las tipo bacteriano se dividen en los subtipos I y II, definidos por su localización celular (intracelular o extracelular respectivamente), afinidad al sustrato y estado de oligomerización [1]. En

contraste, el estudio de las asparaginidasas tipo planta es limitado y se conoce poco a cerca de sus propiedades estructurales y cinéticas [12].

1.4 Asparaginidasas tipo planta, clasificación y distribución

Estudios previos [13, 14] muestran que las asparaginidasas tipo planta tienen un alto porcentaje de similitud en su secuencia de aminoácidos comparadas a las aspartil-glucosaminidasas (AGA's); éstas son amidohidrolasas lisosomales (EC 3.5.1.26) involucradas en el catabolismo de N-oligosacáridos durante la degradación de glucoproteínas [15]. Tanto las AGA's como las asparaginidasas tipo planta pertenecen a la familia de las Ntn-hidrolasas [1, 5, 12, 16]. Las Ntn-hidrolasas son una superfamilia muy diversa de enzimas que difieren en su especificidad al sustrato pero el mecanismo de activación se encuentra altamente conservado [17]. Este tipo de enzimas exhiben un procesamiento autohidrolítico es decir, se sintetizan como precursores inactivos o zimógenos que posteriormente llevan a cabo un paso de activación intramolecular autocatalítico, dicho evento deriva en la generación de dos nuevos péptidos: la subunidad alfa (α) y la subunidad beta (β), donde el aminoácido nucleofílico ahora se encuentra expuesto en el extremo amino terminal de la subunidad β . En este tipo de enzimas no se encuentran dominios representativos, aunque existen secuencias consenso (-GTV/GAVA,-TSTGG-) ubicadas en la región correspondiente a la subunidad beta (fig. 2). Su estado de oligomerización resulta en un típico arreglo heterotetramérico $\alpha\beta\beta\alpha$ (fig. 3) [5, 12, 14, 18, 19, 20].

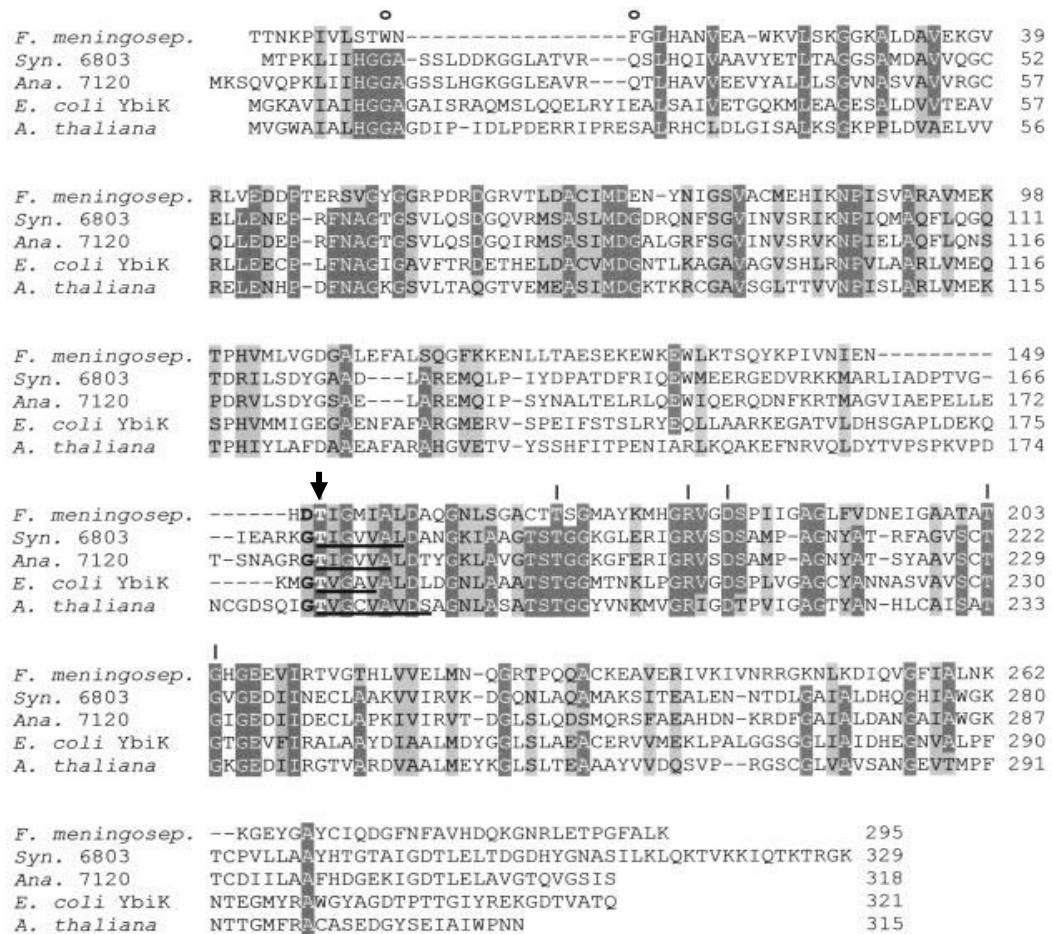


Figura 2. Alineación múltiple de las secuencias de: la aspartilglucosaminidasa de *Flavobacterium meningosepticum* y asparaginidasas tipo planta de *Escherichia coli*, *Arabidopsis thaliana*, *Anabaena* sp. y *Synechocystis* sp. [14]. Los residuos idénticos en las cuatro secuencias se encuentran en gris oscuro, los sitios conservados o semi-conservados en gris claro y la secuencia donde se lleva a cabo el procesamiento autocatalítico se encuentra subrayada, resaltando la treonina como residuo nucleófilo.

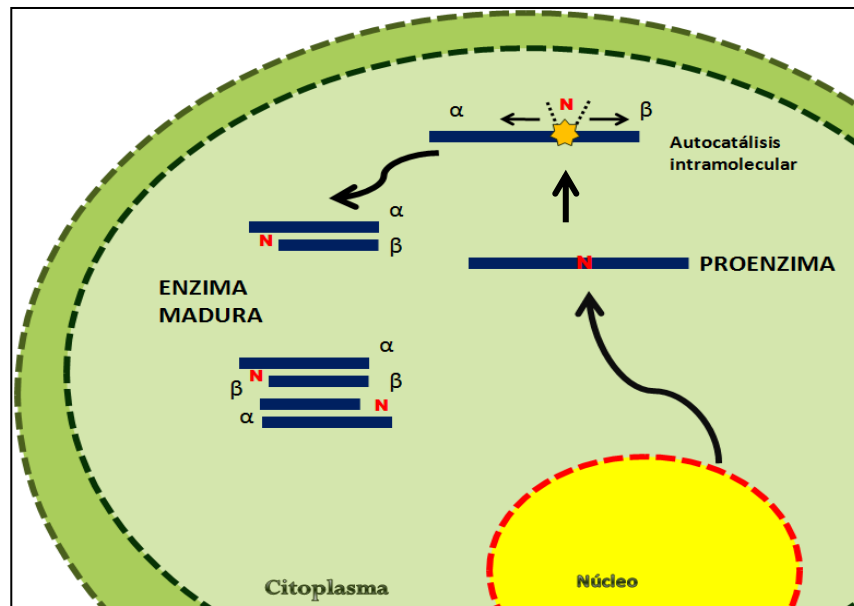


Figura 3. Modelo general del procesamiento intramolecular autocatalítico de las Ntn-hidrolasas.

Las asparaginasas tipo planta se encuentran ampliamente distribuidas en todos los organismos, sin embargo pocas han sido estudiadas y su caracterización es incompleta; entre ellas se encuentran las procedentes de plantas (*Lupinus luteus*, *Arabidopsis thaliana*), cianobacterias (*Anabaena* sp. y *Synechocystis* sp.), bacterias como *E. coli* [14, 20] y recientemente una de humano hASRGL1 [12]. Todas ejercen actividad hidrolítica sobre L-asn, aunque también pueden hidrolizar β -isopéptidos, por lo que de igual manera se ha sugerido ser clasificadas dentro de la familia de las β -aspartil peptidasas [12, 20].

En los últimos años, los agentes quimioterapéuticos para el tratamiento de la LLA han mejorado dramáticamente y entre los más importantes destacan las asparaginasas de tipo bacteriano, sin embargo su uso se ha limitado sólo a tres de

ellas [4, 6]; pese a que son bastante efectivas, presentan efectos tóxicos e inmunogénicos al organismo. Por otro lado, la industria alimentaria requiere de enzimas altamente termotolerantes y termoestables, por lo cual existe una continua búsqueda de enzimas que satisfagan las necesidades demandantes.

1.5 *Thermoplasma acidophilum*

Thermoplasma acidophilum es un arqueón termoacidófilo perteneciente al reino *Archaea*, que crece de forma óptima a 59°C y pH 1-2. Fue aislado por primera vez en pilas de desechos de carbón. Sus células son esféricas y polimórficas sin organelos, ni espacio periplasmático. No cuenta con núcleo definido, y tienen un pH interno de 5.5 [21]. Poseen un cromosoma circular, relativamente pequeño de 1.5 millones de pares de bases secuenciado en su totalidad [22]. Estas características lo hacen un excelente modelo para estudiar proteínas con interés biotecnológico y biomédico. En base al análisis del genoma de *T. acidophilum* se encontró que contiene un marco de lectura abierto (*orf*) *Ta0338* que codifica una proteína con actividad asparaginasa (NP_393817). Estudios enzimáticos y farmacológicos podrían sustentar su uso como agente quimioterapéutico para el tratamiento de la LLA y como una herramienta adicional para mitigar la formación de acrilamida en los alimentos.

2. Materiales y métodos

2.1 Análisis bioinformático

La predicción de la clasificación de la secuencia de aminoácidos de la asparaginasa de *T. acidophilum* se realizó a través de alineaciones tipo ClustalW2 en www.uniprot.org.

2.2 Diseño de oligonucleótidos, amplificación y clonación del gen *Ta0338*

El *orf Ta0338* que codifica la asparaginasa de *T. acidophilum* se amplificó por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). De acuerdo a la secuencia obtenida en la base de datos del NCBI con número de acceso NP_393817, se diseñaron en el programa SerialCloner® dos pares de oligonucleótidos, el primer par amplificó el gen *Ta0338* del genoma de *T. acidophilum* con sus extremos 5' y 3'. El segundo par se utilizó para adicionar dos sitios de corte para las enzimas de restricción *NcoI* y *XhoI* en los extremos 5' y 3', donde las secuencias de reconocimiento de restricción están subrayadas (Tabla 2).

La reacción de PCR se mantuvo a 4°C, para ello se utilizaron 200 ng de ADN genómico de *T. acidophilum* (Anexo 1), 10 µM de cada oligonucleótido, 10 mM del mix de dNTP's (Invitrogen®), 5 mM de MgSO₄, 1 U de la polimerasa de alta fidelidad y buffer PCR 1X en un volumen final de 25 µL. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador BioRad® con un calentamiento inicial a 94°C por 5 minutos, seguido por 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 63°C por 30 segundos y

68°C por 30 segundos. Por último se continuó por un periodo de extensión final a 68°C por 10 minutos.

Los productos de amplificación se purificaron usando el *kit* de purificación de Qiagen® (Anexo 2). Posteriormente se realizó una segunda amplificación para adicionar una secuencia de poli-A por la *Taq* polimerasa, la mezcla de reacción consistió en PCR buffer 1X, MgCl₂ 2 mM, dATP's 2 mM, 5 µL del producto de PCR, 1 U de *Taq* polimerasa en un volumen final de 25 µL. Los amplicones fueron analizados en geles de agarosa al 1% (Anexo 3).

Tabla 2. Oligonucleótidos específicos para la amplificación del gen *Ta0338* y clonación en el vector de expresión pET28a(+).

Nombre	Secuencia
<i>Ta0338-1</i> sentido	5'-ATGAGGAACGTTCTTCTGATCC-3'
<i>Ta0338-1</i> antisentido	5'-GAACTCCTTTATGCCCACAGC-3'
<i>Ta0338-2</i> sentido	5'-CATGCCATGGCAATGAGGAACGTTCTTCTGATCC-3'
<i>Ta0338-2</i> antisentido	5'-CCGCTCGAGGAACTCCTTTATGCCCACAGC-3'

2.3 Vector de expresión pET28a(+)

La clonación del gen *Ta0338* previamente amplificado por el segundo par de oligos se llevo a cabo utilizando el sistema de expresión pET28a(+) de

Invitrogen®. El diseño permitió adicionar una etiqueta de seis histidinas en el extremo carboxilo terminal de la secuencia codificante para su purificación.

2.3.1 Digestión con las enzimas de restricción *NcoI* y *XhoI*

La digestión del vector de expresión pET28a(+) y del producto de amplificación se realizaron en reacciones por separado. A las mezclas de reacción se les agregó 1 µg de pET28a(+) o 10 µg de producto de amplificación, buffer número 2 1X (New England Biolabs®), BSA 1X (New England Biolabs®), 1 U de cada una de las enzimas *NcoI* y *XhoI* y se llevó a un volumen final de 25 µL. Las mezclas de reacción se incubaron a 37°C por 1 hora. Posteriormente se corrió un gel de agarosa al 1% para confirmar el análisis de restricción y después se purificó la banda de DNA utilizando el *kit* de Qiagen® (Anexo 4).

2.3.2 Ligación

La ligación se realizó por medio de la enzima comercial de rápida ligación Ligasa T4 de Promega®; a la mezcla de reacción se le adicionó buffer de ligación 2X, 1 U de Ligasa T4 a una relación 1:5 de vector:inserto en un volumen final de 10 µL. La reacción se incubó a 16°C durante toda la noche.

2.3.3 Transformación

Se prepararon células calcio-competentes de *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS (Anexo 5). A cada vial de células competentes (80 µL) se adicionaron 10 µL de la mezcla de la reacción de ligación; el vial se mantuvo en hielo durante 30 minutos y a continuación se sometió a choque térmico a 42°C por 1 minuto, inmediatamente después se pasó a hielo y se resuspendió en 1 mL de medio LB (Anexo 6) colocándolo a 37°C por 1 hora a 200 rpm. El contenido del vial se plaqueó en una caja de Petri con medio agar LB con antibióticos de selección (Anexo 7) y se incubó a 37°C durante toda la noche. Se seleccionaron las clonas positivas y se realizó PCR de colonia (Anexo 8) para confirmar la presencia del inserto. Por último se crecieron en 5 mL de LB con antibióticos de selección.

2.3.4 Minipreparaciones (*kit* Qiaprep, Qiagen®)

Las células del cultivo anterior se recuperaron por centrifugación a 5,000 rpm por 10 minutos a 4°C y la pastilla celular se resuspendió de acuerdo al protocolo del *kit* Qiaprep® (Anexo 9). El DNA plasmídico resultante se eluyó en 100 µL de agua estéril libre de nucleasas y se cuantificó en un nanoDrop® a 260/280 nm. La construcción peT28a(+)/Ta0338 se verificó por medio de un análisis de restricción con las enzimas *Nco*I y *Xho*I y el producto de la digestión se resolvió en gel de agarosa al 1%. Las colonias positivas se secuenciaron para confirmar la fidelidad de la secuencia del gen *Ta0338*. De las clonas positivas se hicieron respaldos en glicerol al 15% (Anexo 10) y se almacenaron a -80°C para su posterior utilización.

2.4 Expresión de la construcción pET28a(+)/Ta0338

De las colonias positivas y verificadas por secuenciación, se seleccionó una y se realizó la expresión de la asparaginasa recombinante. Los ensayos de expresión se llevaron a cabo en 50 mL de medio LB y sus respectivos antibióticos de selección con el fin de determinar los valores óptimos de temperatura y tiempo de inducción.

De acuerdo a lo anterior, se realizó un preinóculo de 25 mL de LB con sus respectivos antibióticos de selección y se creció a 37°C toda la noche con agitación constante a 200 rpm. Posteriormente, se adicionó una relación 1:60 de volumen de preinóculo en 1 L de LB con sus respectivos antibióticos y se incubó a 37°C hasta que se alcanzó una densidad óptica ($OD_{600\text{ nm}}$) de 0.5-0.6. A continuación se adicionó IPTG a concentración final de 1 mM. Después de 8 horas de inducción a 37°C se recuperaron las células por centrifugación a 7,500 rpm durante 20 minutos a 4°C. La pastilla celular se resuspendió en buffer nativo de unión pH 8 (Anexo 14) y se sonicó durante 1 minuto con 10 pulsos de 10 segundos y 10 segundos de descanso a una amplitud de 30%, manteniendo en hielo el vial. Posteriormente se centrifugó a 7,500 rpm por 35 minutos a 4°C y se conservaron las fracciones resultantes, éstas se analizaron por geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 10% (Anexo 11).

2.5 Purificación en condiciones nativas

2.5.1 Cromatografía de afinidad a níquel (Ni-NTA) Invitrogen®

La fracción soluble se vertió en una columna con resina de níquel previamente equilibrada (Anexo 14) y se incubó por 3 horas a 4°C con agitación constante. La resina se dejó en reposo y se retiró el sobrenadante de la columna, se continuó con cuatro lavados con buffer de lavado y por último, se recuperó la proteína con 8 mL de buffer de elución (Anexo 14). Las fracciones obtenidas se analizaron en geles desnaturizantes de poliacrilamida al 10% (Anexo 11). La proteína pura total se dializó con Mini Dialysis Kit (GE Healthcare®) durante toda la noche en una solución de Tris-HCl 10 mM pH 7 a 4°C y posteriormente se conservó en solución con glicerol al 40% (v/v) a -20°C.

2.6 Cuantificación de proteína

La concentración de proteína se determinó por medio de Bio-Rad protein assay solution® (ensayo de Bradford) y empleando una curva estándar de albúmina bovina sérica (Anexo 15).

2.7 Determinación de proteína

El análisis electroforético de la proteína recombinante purificada se realizó en geles de poliacrilamida desnaturizantes de gradiente del 4 al 20% y el estado de oligomerización se determinó en geles de poliacrilamida en condiciones nativas de gradiente del 4 al 20% (Anexo 11). Las proteínas fueron separadas a una corriente de 80 volts durante 16 horas a 4°C. Los geles se visualizaron por la tinción de Coomassie coloidal al 0.06% (Anexo 12). La expresión de la asparaginasa

recombinante se confirmó por medio de un Western blot (Anexo 13) en membranas de nitrocelulosa y en una cámara horizontal Semi-Dry Bio-Rad® utilizando un anticuerpo policlonal anti-His tag producido en ratón y un anticuerpo policlonal secundario anti-IgG de ratón conjugado a fosfatasa alcalina (Sigma®).

2.8 Procesamiento *in vitro*

Para determinar la progresión del procesamiento autocatalítico de la asparaginasa recombinante, se prepararon alícuotas de 25 μ L de la proteína pura y se incubaron a 37°C y a 4°C durante 0, 24, 48, 72, 96, 120, 144 y 168 horas. Las muestras se analizaron en geles desnaturalizantes de poliacrilamida del 4 al 20% y se visualizaron con tinción de Coomassie coloidal al 0.06%. La evaluación cuantitativa del proceso intramolecular autocatalítico se realizó mediante un análisis de densitometría empleando el software Quantity One 4.5.0 Bio-Rad®.

2.9 Determinación de la actividad enzimática

La determinación de la actividad enzimática de la asparaginasa recombinante se estableció con un ensayo enzimático NADH-acoplado [8, 20, 23, 24]. A la mezcla de reacción se le agregaron 900 μ L de buffer de reacción (Anexo 16), L-asparagina 10 mM, NADH 0.135 mM y enzima pura 6 nM. La mezcla de reacción se incubó a 37°C por 30 minutos y posteriormente se monitoreo la disminución de la absorbancia a 339 nm ($\Delta A_{339 \text{ nm}}$) en un espectrofotómetro UV-Visible Cary 50 Bio® ocasionada por la oxidación del NADH. La $\Delta A_{339 \text{ nm}}$ corresponde al cambio

de concentración de NADH (coeficiente de extinción = 6.22 mM⁻¹ cm⁻¹) que se usa para determinar la actividad enzimática específica con la siguiente fórmula:

UNIDADES/mg = (ΔA_{340} /minuto)/(6.22 * mg enzima* mezcla de 1 mL* celda de 1 cm de vía óptica)

3. Resultados y discusión

3.1 Análisis bioinformático

Las características bioquímicas y estructurales de las asparaginidas tipo planta han sido estudiadas desde la década pasada debido a su interés comercial. Se ha sugerido que estas enzimas pertenecen a la superfamilia de las Ntn-hidrolidas, las cuales necesitan de un procesamiento autoproteolítico para ser activas [5, 12, 14, 18, 20]. La secuencia de la enzima con actividad asparaginasa de *T. acidophilum* se clasificó mediante una alineación tipo ClustalW2 dentro de las asparaginidas tipo planta y las Ntn-hidrolidas (fig. 4).

Con base a la alineación de la secuencia de aminoácidos e identidad de residuos conservados de asparaginidas tipo planta previamente caracterizadas, se identificó a la treonina 161 (T161) de la asparaginasa de *T. acidophilum* como posible residuo nucleófilo, definiendo así el sitio donde se lleva a cabo el procesamiento intramolecular autocatalítico para generar la subunidad alfa (residuos 2-160) y beta (residuos 161-274). Al parecer la T161 actúa como residuo catalítico y se encuentra altamente conservada entre todas las asparaginidas tipo planta que se conocen [5, 12, 13, 14, 16].

La tabla 2 muestra el porcentaje de identidad de residuos conservados de asparaginidas tipo planta respecto la secuencia de aminoácidos de la asparaginasa de *T. acidophilum*, donde el porcentaje más alto fue el obtenido para la enzima tipo asparaginasa de humano (hASRGL1) con un 38%.

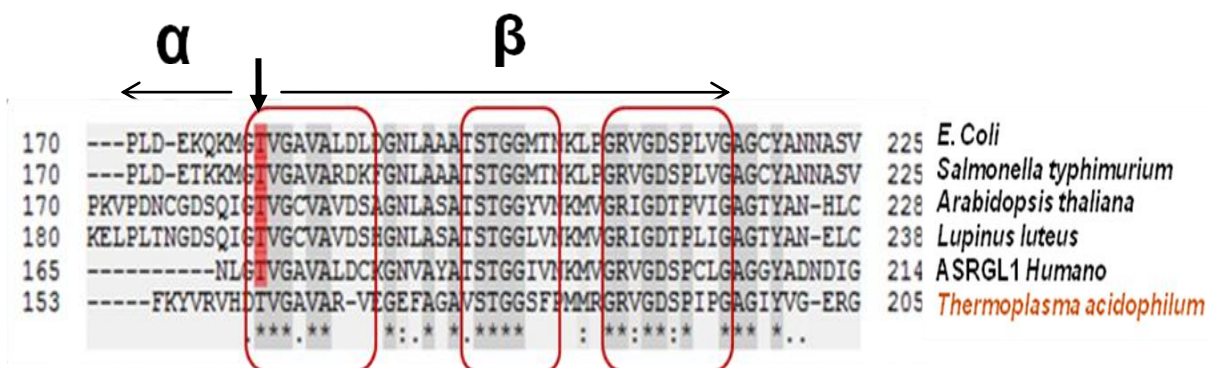


Figura 4. Alineación múltiple tipo ClustalW2 de secuencias de aminoácidos de la asparaginasa de *T. acidophilum* y asparaginasa tipo planta. Los recuadros señalan los residuos conservados y el residuo treonina marcado con una flecha indica el sitio donde podría llevarse a cabo la autocatálisis.

Tabla 3. Porcentaje de identidad de aminoácidos de la secuencia de la asparaginasa de *T. acidophilum* respecto a algunas asparaginasa tipo planta caracterizadas

Enzima	Organismo	% identidad
EcAIII	<i>Escherichia coli</i>	33
StyA	<i>Salmonella typhimurium</i>	28
At3g16150	<i>Arabidopsis thaliana</i> K ⁺	31
LIA	<i>Lupinus luteus</i>	34
hASGRL1	<i>Homo sapiens</i>	38

3.2 Clonación del gen *Ta0338* en el vector de expresión pET28a(+)

Se obtuvieron 6 clonas positivas transformadas con la construcción pET28a(+). La figura 5A muestra un análisis de restricción de una de las clonas positivas, donde se evidencia la presencia del inserto de tamaño esperado (825 pb). En la figura 5B se ejemplifica el sitio de clonación del gen *Ta0338* en el diagrama del vector de expresión pET28a(+). El análisis de secuenciación de ADN de las clonas positivas confirmó el 100% de identidad respecto a la secuencia del *orf Ta0338* reportada en la base de datos del NCBI con número de acceso NP_393817.

3.3 Expresión, purificación y análisis de inmunoblot de la proteína recombinante

La inducción de la asparaginasa recombinante se llevó a cabo a 37°C durante 8 horas de incubación después de adicionar IPTG a cultivos con una densidad óptica de 0.6 (OD₆₀₀ nm). La fracción soluble que contiene la enzima recombinante se purificó a través de cromatografía de afinidad a níquel (Ni-NTA) recuperando 9.68 mg de proteína pura por litro de cultivo.

La inducción y purificación de la asparaginasa recombinante se confirmaron por electroforesis en geles con un gradiente del 4 al 20% de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes y nativas. La figura 6A muestra un gel desnaturalizante de poliacrilamida al 10% donde se observa una banda de ~32 kDa, correspondiente al tamaño esperado del zimógeno o precursor

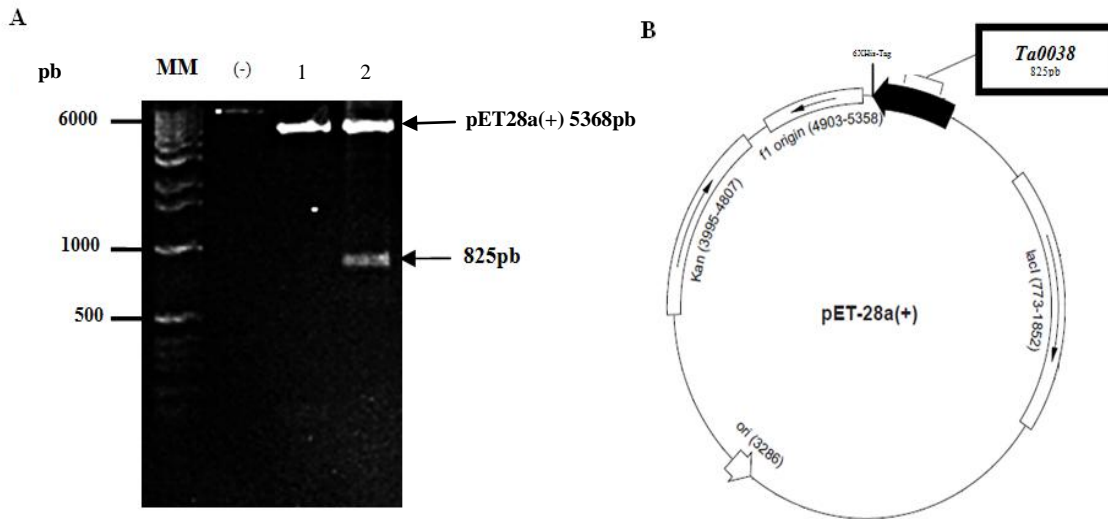


Figura 5. Clonación del gen *Ta0338* en el vector de expresión pET28a(+). A) Análisis de restricción con las enzimas *NcoI* y *XhoI* que confirma el fragmento de 825 pb correspondiente al gen *Ta0338* en el vector de expresión pET28a(+) en un gel de agarosa al 1%. MM, marcador de peso molecular; (-), control negativo; carril 1, vector vacío; carril 2, construcción pET28a(+)/*Ta0338* . B) Diagrama de la construcción pET28a(+)/*Ta0338*.

de la asparaginasa recombinante. La expresión de la proteína se confirmó por Western blot con un anticuerpo anti-His tag (fig. 6B).

La figura 6C muestra un gel en condiciones nativas de gradiente del 4 al 20% donde se observa la presencia de una banda única con un peso molecular aproximado de 64 kDa, sugiriendo una conformación heterotetramérica ($\alpha\beta\beta\alpha$) común para las Ntn-hidrolasas, aunque a esta familia de enzimas también se le atribuyen otros estados de oligomerización como heterodímeros ($\alpha\beta$) (penicilina acilasa G) y 14 subunidades para el proteasoma de *T. acidophilum* [1]. La asparaginasa recombinante no mostró otros arreglos.

3.4 Procesamiento autocatalítico *in vitro*

Para caracterizar el procesamiento autocatalítico de la enzima recombinante, se monitoreó la conversión del precursor o zimógeno de ~32 kDa a su forma madura (subunidad alfa de ~18 kDa y beta de ~13 kDa) en función del tiempo (días) y temperatura (a 37°C y 4°C), condiciones que favorecen la autoproteólisis enzimática *in vitro* [17].

Para determinar la temperatura óptima de procesamiento *in vitro*, se realizó una cinética de procesamiento de la asparaginasa recombinante a 37°C y otra a 4°C en función del tiempo.

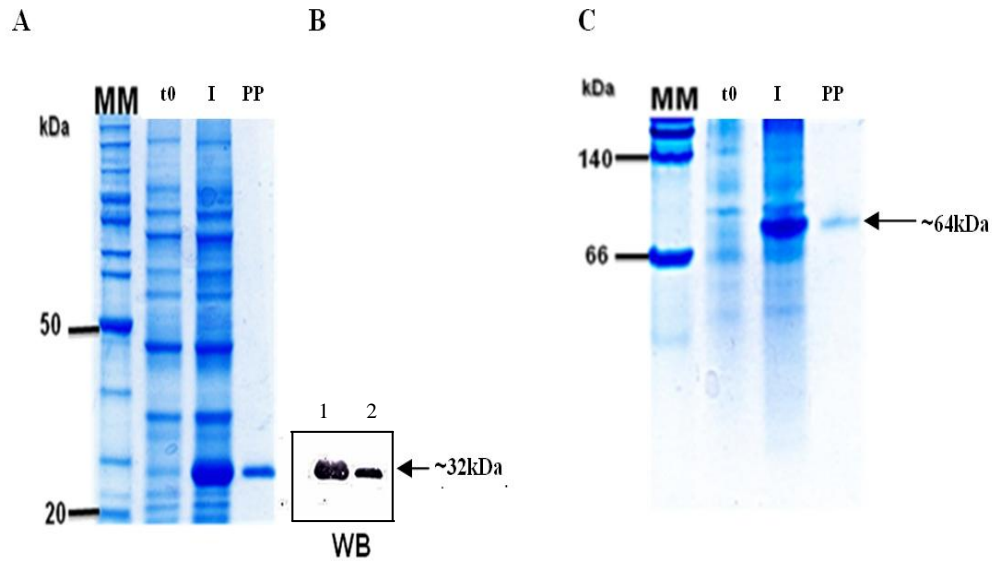


Figura 6. Expresión, purificación y análisis de inmunoblot de la asparaginasa recombinante. A) Gel de poliacrilamida desnaturalizante al 10%, MM, Marcador de Masa Molecular; t0, extracto crudo de células de *E. coli* sin IPTG; I, inducción con IPTG 1 mM; PP, proteína purificada por cromatografía de afinidad. B) Western blot con anticuerpo anti-His tag, carril 1, inducción, carril 2, proteína pura. C) Gel de poliacrilamida en condiciones nativas 4-20%, heterotetrámero de ~64 kDa. MM, Marcador de Masa Molecular; t0, extracto crudo de células de *E. coli* sin IPTG; I, inducción con IPTG; PP, proteína purificada.

La incubación a 37°C reveló una evidente disminución en la intensidad de la banda del zimógeno concomitante con el incremento de la intensidad en las bandas correspondientes a las subunidades alfa y beta, contrariamente a lo que se observa en la cinética a 4°C, donde no se ve favorecido el procesamiento autocatalítico (fig. 7). La figura 8A muestra un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes de la cinética del procesamiento autocatalítico a 37°C durante 7 días de incubación, donde se observan las 3 bandas correspondientes al zimógeno y las subunidades alfa y beta. La figura 8B muestra un Western blot con un anticuerpo anti-His tag que identificó las histidinas del carboxilo terminal de la proteína recombinante, de manera que únicamente se observan las bandas del zimógeno y la subunidad β que contienen la etiqueta de histidinas (fig. 5B).

Anteriormente, se ha descrito que las enzimas de la superfamilia Ntn-hidrolasas llevan a cabo un proceso de escisión espontánea [1, 5, 12, 14, 16, 18, 20, 25], este mecanismo *in vitro* puede darse en cuestión de horas o en días para enzimas recombinantes, tal es el caso de la asparaginasa de *Lupinus luteus* [5] y la asparaginasa tipo planta de humano (hASRGL1), enzimas previamente caracterizadas. En la hASRGL1, el proceso completo de maduración es observado a las 48 horas a 37°C [12].

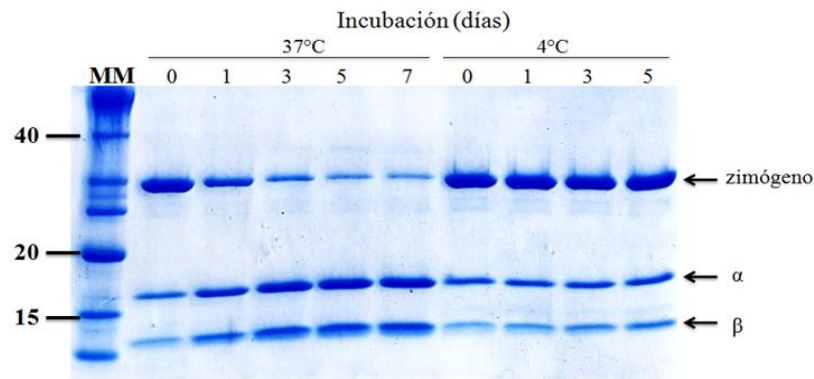


Figura 7. Procesamiento autocatalítico *in vitro* de la asparaginasa recombinante a 37°C y 4°C. Gel desnaturizante de poliacrilamida de 4 al 20%. Cinética del proceso de autocatálisis de la enzima recombinante en función del tiempo en días a 37°C y 4°C.

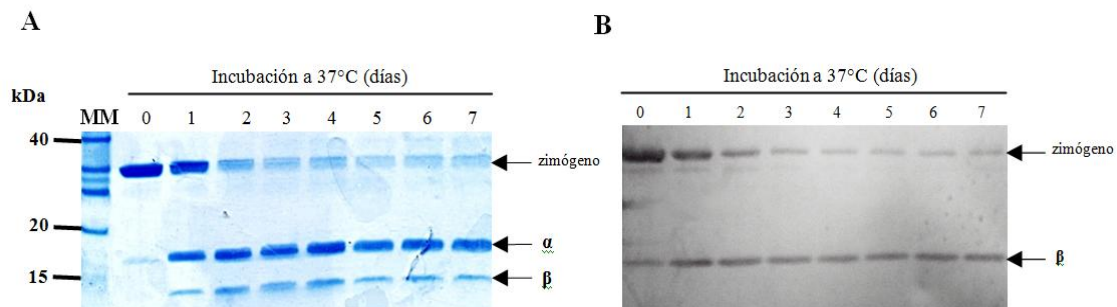


Figura 8. Cinética del procesamiento autocatalítico *in vitro* de la asparaginasa de *T. acidophilum* a 37°C. A) Gel desnaturizante de poliacrilamida de 4 al 20%. Progresión del proceso de autocatálisis *in vitro* de la enzima recombinante en función del tiempo (días). B) Western blot utilizando un anticuerpo anti-His tag, donde se visualizan únicamente la proenzima y la subunidad beta.

Respecto a la asparaginasa recombinante de *T. acidophilum* observamos que a partir del quinto día de incubación a 37°C no aumenta el procesamiento autocatalítico. En la figura 9 se presenta la evaluación cuantitativa del grado de procesamiento *in vitro* de la asparaginasa recombinante, determinada por análisis densitométrico de la figura 5A en el programa Quantity One 4.5.0. Se muestra el porcentaje de procesamiento correspondiente al aumento de la formación de las subunidades alfa y beta y por lo tanto la disminución del zimógeno.

La actividad intramolecular autocatalítica de este tipo de enzimas puede ser dependiente de las condiciones a las que se desarrolla el procesamiento *in vitro* como pH y temperatura de incubación [17, 18], estas circunstancias son importantes para beneficiar la autoactivación enzimática. Por ejemplo, en la enzima lisosomal ácido-ceramidasa de humano, el procesamiento *in vitro* ocurre más eficientemente a pH ácido (4.5) correspondiente al pH interno de los lisosomas, sugiriendo la necesidad de recrear las condiciones en las que se encuentra normalmente la enzima [17]. Por lo anterior, se puede esperar que el proceso intramolecular de autocatálisis *in vitro* de la asparaginasa recombinante sea más eficiente a pH ácido, condiciones internas y óptimas de crecimiento para *T. acidophilum* [21].

3.5 Determinación de la actividad enzimática

La determinación de la actividad enzimática de la asparaginasa recombinante se realizó por medio de un ensayo enzimático NADH-acoplado, basado en la medición de la liberación de ácido aspártico (L-asp) como producto de la reacción. Este ensayo utiliza un sistema de enzimas auxiliares, y se basa en a) la reacción de hidrólisis donde se libera L-asp b) subsecuentemente con la transaminación del aspartato hacia oxalacetato por la glutamato oxalacetato transaminasa (GOT) en presencia de α -cetoglutarato y c) la formación del NAD^+ después de la reducción mediada por la malato deshidrogenasa (MDH) del oxalacetato a malato con el NADH como cofactor. La disminución de la concentración de NADH (oxidación) se midió espectrofotométricamente a 339 nm [5, 20, 23, 24].

La actividad catalítica de la asparaginasa recombinante se realizó en varios ensayos independientes. Sin embargo, los experimentos no han sido reproducibles, por lo cual es necesario estandarizar el método para establecer los parámetros enzimáticos como K_m y V_{max} y así comparar la eficiencia catalítica respecto a otras enzimas con actividad asparaginasa.

La figura 10 muestra una gráfica representativa de la actividad hidrolítica de la asparaginasa recombinante en un ensayo único, donde se observa la disminución de la absorbancia a 339 nm proporcional a la disminución de la concentración de NADH, ocasionada por la formación de L-asp. En todos los ensayos, la asparaginasa se incubó previamente a 37°C durante 3 días, condición óptima a la cual la enzima se encuentra procesada y es activa.

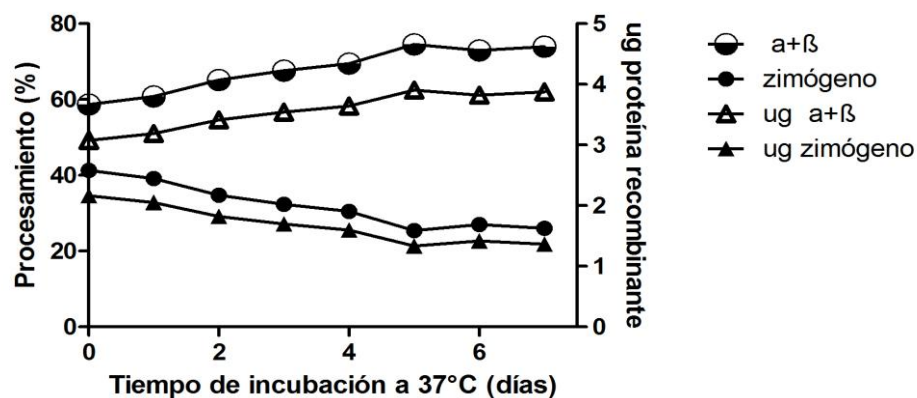


Figura 9. Evaluación del grado de procesamiento autocatalítico *in vitro* de la asparaginasa recombinante. Porcentaje del procesamiento autohidrolítico *in vitro* de la asparaginasa recombinante mediante análisis densitométrico en función del tiempo.

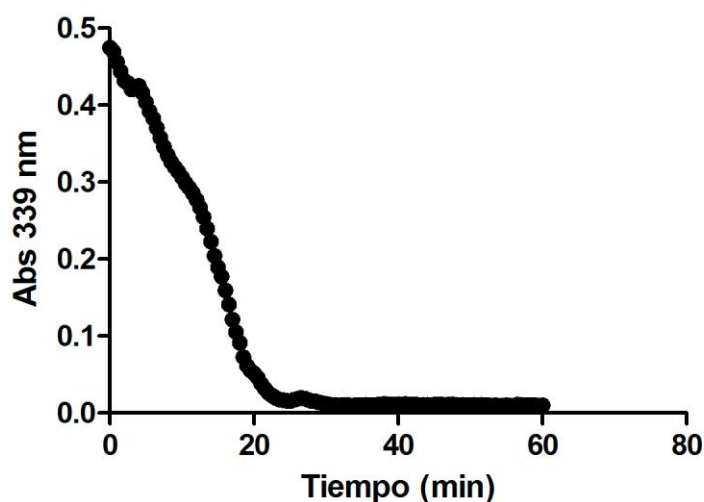


Figura 10. Cinética de la actividad enzimática de la asparaginasa tipo planta de *T. acidophilum*. Disminución de la absorbancia debida a la oxidación del NADH por la actividad hidrolítica de la asparaginasa recombinante (6 nM) al hidrolizar L-asn (10 mM). Ensayo único.

4. Conclusiones

1. El gen *Ta0338* de *Thermoplasma acidophilum* codifica una asparaginasa clasificada dentro de las asparaginasa tipo planta y la superfamilia de las Ntn-hidrolasas.
2. La asparaginasa recombinante exhibe procesamiento autocatalítico que genera dos subunidades a partir del zimógeno de 32 kDa: la subunidad alfa de 18 kDa y la beta de 13 kDa.
3. El procesamiento autocatalítico *in vitro* de la asparaginasa recombinante se favorece incubando la enzima pura a 37°C.
4. El ensayo de actividad asparaginasa ha sido inconsistente y debe estandarizarse.

5. Perspectivas de trabajo

- Determinar las condiciones óptimas de procesamiento *in vitro*: pH y tiempo a distintas temperaturas (25°, 37°C, etc.).
- Estandarizar el método enzimático acoplado-NADH para medir la actividad enzimática, así como establecer concentración óptima, perfil de pH y termotolerancia de la asparaginasa recombinante.
- Verificar la secuencia de aminoácidos de la enzima recombinante por espectrometría de masas.

6. Referencias

1. Michalska K, Jaskolski M (2006). Structural aspects of L-asparaginases, their friends and relations. *Acta Biochimica Polonica*. 53 (4): 627-640.
2. Broome JD (1963). Evidence that the L-asparaginase of guinea pig serum is responsible for its antilymphoma effects. *Partly described in Nature*. 191: 1114.
3. Vasillos IA, Pakrash NT (2006). Asparaginase (native ASNase or pegylated ASNase) in treatment of acute lymphoblastic leukemia. *International Journal of Nanomedicine*, 1(3): 241–254.
4. Pieters R, Stephen PH, Boos J, Rizzari C, Silverman L, Baruchel A, Goekbuget N, Shrappe M, Ching-Hon P (2010). L-Asparaginase Treatment in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Wiley Online Library* (www.wileyonlinelibrary.com).
5. Borek D, Michalska K, Brzezinski K, Kisiel A, Kisiel A, Podkownski J, Bonthron D, Krowarsch D, Otlewski J, Jaskolski M (2004). Expression, purification and catalytic activity of *Lupinus luteus* asparagine β -amidohydrolase and its *Escherichia coli* homolog. *Eur. J. Biochem.*, 271:3215-3226.
6. Kotzia G, Labrou NE (1996). L-asparaginase from *Erwinia chrysanthemi* 3937: cloning, expression and characterization. *Journal of Biotechnology*, 127: 657-669.

7. Stams WA, den Boer ML, Holleman A, Appel IM, Berna BI, van Wering ER, Janka-Schraub GE, Evans WE, Pieters R (2005). Asparagine synthetase expression is linked with L-asparaginase resistance in *TEL-AML1*-negative but not *TEL-AML1* pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 105 (11): 4223-4225.
8. Kafkewitz D, Bench A (1983). Enzyme-induced asparagine and glutamine depletion and immune system function. *Am J Clin Nutr*. 37(6):1025-30.
9. Aslanian AM, Kilberg MS (2001). Multiple adaptive mechanisms affect asparagine synthetase substrate availability in asparaginase-resistant MOLT-4 human leukaemia cells. *Biochem J*. 15; 358 (1):59-67.
10. Geiger Hartmut (2007). *N Engl J Med*.
<http://www.savai.cl/link.cgi/CienciayMedicina/ProgresosMedicos/10046>.
11. Hendriksen HV, Kornbrust BA, Østergaard PR, Stringer MA (2009). Evaluating the potential for enzymatic acrylamide mitigation in range of food products using an asparaginase from *Aspergillus oryzae*. *J. Agric. Food Chem.*, 57:4168-4176.
12. Cantor JR, Stone EM, Chantranupong L, Georgiou G (2009). The human Asparaginase-like protein 1 hASRGL1 is an Ntn Hydrolase with β -aspartyl peptidase activity. *Biochemistry*, 48:11026-11031.
13. Borek D, Jaskólski M (2001). Sequence analysis of enzymes with asparaginase activity. *Acta Biochimica Polonica*, 48:4.

14. Hejazi M, Piotukh K, Mattow J, Deutzmann R, Volkmer-Engerts R, Lockau W (2002). Isoaspartyl dipeptidase activity of plant-type asparaginases. *Biochem. J.*, 364:129-136.
15. Noronkoski T, Stoineva IB, Petkov DD, Mononen I (1997). Recombinant human glycosylasparaginase catalyzes hydrolysis of L-asparagine. *FEBS letters*, 412: 149-152.
16. Aronsron N (1996). Lysosomal glycosylasparaginase: a member of a family of amidases that employ processed N-terminal threonine, serine or cysteine as a combined base-nucleophile catalyst. *Glycobiology*. 6 (7): 669-675.
17. Shtraizent N, Eliyahu E, Park JH, He X, Shalgi R., Schuchman EH (2008). Autoproteolytic cleavage and activation of human acid ceramidase. *The journal of biological chemistry*. 283 (17): 11253-11259.
18. Boanca G, Sand A, and Barycki J (2006). Uncoupling the enzymatic and autoproducting activities of *Helicobacter pylori* γ -glutamyltranspeptidase. *The journal of biological chemistry*, 281:19029–19037.
19. Galperin MY, Koonin EV (2011). Divergence and convergence in enzyme evolution. *The journal of biological chemistry*. 287 (1): 21-28.
20. Bruneau L, Chapman R, Marsolais F (2006). Co-occurrence of both L-asparaginase subtypes in *Arabidopsis*: At3g16150 encodes a K⁺-dependent L-asparaginase. *Planta*, 224:668-679.

21. Hsung JC, Haug A (1975). Intracellular pH of *Thermoplasma acidophila*. *Biochim Biophys Acta*. 389 (3): 477-482.
22. Ruepp A, Graml L, Santos-Martínez ML, Koretke KK, Volker C, Mewes HW, Frishman D, Stocker S, Lupas AN, Baumeister W (2000). The genome sequence of the thermoacidophilic scavenger *Thermoplasma acidophilum*. *Nature*. 407: 508-513.
23. Cooney DA, Capizzi RL, Handschumacher RE (1970). Evaluation of L-asparagine metabolism in animals and man. *Cancer research*. 30: 929-935.
24. Martins MB, Gonçalves AP, Cruz ME (1996). Biochemical characterization of an L-asparaginase bioconjugate. *Bioconjugate Chem.*, 7: 430-435.
25. Brannigan JA, Dodson G, Duggleby HJ, Moody PC, Smith JL, Tomchick DR, Murzin AG (1995). A protein catalytic framework with an N-terminal nucleophile is capable of self activation. *Nature*. 378: 416-418.
26. Aswad DW, Paranandi MV, Schurter BT (2000). Isoaspartate in peptides and proteins: formation, significance and analysis. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 21: 1129-1136.

7. Anexos

Anexo 1

Extracción de DNA Genómico de *Thermoplasma acidophilum*

La metodología de extracción se realizó como sigue:

SOLUCIONES

Solución TNE (50mL)

5 mL Tris HCl 1 M

5 mL NaCl 1 M

5 mL EDTA 0.5 M

Aforar con agua destilada estéril

Solución TE (50 mL)

500 µL Tris HCl 1 M

200 µL EDTA 0.5 M

Aforar con agua destilada estéril

PROTOCOLO:

1.- Tomar de 250 mL del cultivo de células de *T. acidophilum* a una OD_{540nm} de 0.5 aproximadamente y centrifugar a 6000 g por 15 min a temperatura ambiente. Se

resuspende la pastilla resultante en 8 mL de solución TNE y añadir 0.125 mL de SDS 10%. Mezclar y en seguida agregar 0.5 mL de proteinasa K a una concentración de 20 mg/mL y por ultimo incubar durante 3 horas a 50°C.

2.- El lisado se mezcla con 11 mL de fenol saturado con solución TE. Centrifugar a 5400 g por 10 min a 20°C para separar las fases orgánica y acuosa. Transferir la fase acuosa a un nuevo tubo y nuevamente repetir el lavado con fenol. Posteriormente añadir 11 mL de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1 vol/vol) y mezclar 10 min. Para separar las fases se centrifugó a 5400 g durante 10 min a 20°C.

3.- Tomar la fase acuosa y dividirla en alícuotas de 3 mL aproximadamente y añadir 8 mL de etanol al 95% para cada alícuota e incubar por 1 hora a 20°C. Centrifugar a 2000 rpm por 15 min a 4°C para obtener la pastilla de ADN.

4.- Una vez obtenida resuspenderla en 3 mL de etanol al 70% y centrifugar a 1000 rpm durante 10 min a 20°C. Repetir el lavado con etanol y centrifugar nuevamente. Secar la pastilla dejando el tubo abierto durante 15 min a temperatura ambiente y finalmente resuspender en 2 mL con solución TE.

5.- Añadir 3 µL de ARNasa libre de ADNasas a una concentración de 10 mg/mL e incubar con agitación durante 1 hora a 37°C. Almacenar en el congelador a -80°C.

Anexo 2

Purificación del producto de PCR (kit de purificación Qiagen®)

PROTOCOLO

Purificación de fragmentos de DNA de cadena doble o sencilla (100pb-10Kb)

- 1.- Adicionar 5 volúmenes de buffer PB a 1 volumen de producto de PCR y mezclar. Por cada 500 µL de buffer PB adicionar 100 µL de muestra.
- 2.- Verificar que el buffer sea de color amarillo, de lo contrario adicionar 10 µL de acetato de sodio 3 M pH 5.0.
- 3.- Agregar la muestra a la columna y centrifugar a 13,000 rpm por 1 minuto a 4°C.
- 4.- Descartar sobrenadante. Lavar la columna con 750 µL de buffer PE y centrifugar 13,000 rpm por 1 minuto a 4°C, retirar sobrenadante y repetir paso 4.
- 5.- Colocar la columna en un tubo limpio y estéril. Eluir con 50 µL de agua libre de nucleasas y reposar 2 minutos. Posteriormente, centrifugar a 13,000 rpm por 1 minuto a 4°C y conservar el producto a -20°C.

Anexo 3

Geles de agarosa 1%

Buffer TAE 50X (1 L)

242 g Tris BASE

57.1 mL ácido Glacial

100 mL EDTA 0.5 M pH 8.0

Aforar a 1 L con agua destilada y ajustar pH 8.0

Buffer TAE 0.5X	40 mL
Agarosa	0.4 g

1.- Mezclar el TAE 0.5X y la agarosa. Calentar hasta que la agarosa quede totalmente disuelta.

2.- Adicionar 1 μ L de bromuro de etidio 100 mg/mL, mezclar y colocar en el soporte hasta que solidifique.

Anexo 4

Purificación de gel (kit de purificación Qiagen®)

PROTOCOLO

Purifica 70 pb-10 kb

- 1.- Cortar la banda de DNA del gel de agarosa y colocarla en un tubo ependorf previamente pesado.
- 2.- Adicionar 3 volúmenes de buffer QG (ej. 300 μ L de buffer QG por cada 100 mg de gel). Incubar por 10 minutos a 50°C o hasta que se disuelva completamente.
- 3.- Agregar un volumen de isopropanol y mezclar suavemente (ej. 100 μ L de isopropanol por cada 100 mg de gel).
- 4.- Colocar la muestra en la columna y centrifugar a 13, 000 rpm por 1 minuto a 4°C. Descartar sobrenadante.
- 5.- Adicionar 500 μ L de buffer QG, centrifugar nuevamente y retirar sobrenadante.
- 6.- Lavar con 750 μ L de buffer PE y centrifugar nuevamente, retirar sobrenadante y repetir este paso.
- 7.- Eluir con 30 μ L de agua libre de nucleasas y colocarlo en un tubo nuevo. Dejar reposar por 2 minutos y centrifugar. Conservar sobrenadante.

Anexo 5

Células Calcio competentes

REACTIVOS

CaCl ₂ 0.1M		Estéril
Glicerol 80%	80 mL de glicerol y aforar en 100 mL agua destilada	Estéril
LB medio	20 g/L	Estéril

PROCEDIMIENTO

- 1.- Se selecciona una sola colonia de la placa de LB agar que contiene la cepa de interés.
- 2.- Crecer el preinóculo en 20 mL de LB durante toda la noche.
- 3.- Inocular 1 mL de preinóculo en 50 mL de medio de cultivo e incubar a 37°C hasta alcanzar una OD_{600nm} de 0.6.
- 4.- Reposar en hielo durante 30 minutos.
- 5.- Colectar las células por medio de centrifugación a 7,000 rpm durante 10 minutos a 4°C.
- 6.- Recuperar el pellet de células y resuspenderlo en 45 mL de CaCl₂ 0.1 M estéril. Reposar en hielo 30 minutos agitando suavemente y de forma constante.
- 7.- Centrifugar nuevamente a 7,000 rpm durante 10 minutos a 4°C.
- 8.- Resuspender el pellet en 350 µL de CaCl₂ y 50 µL de glicerol al 80%.

9.- Alicuotar 80 μ L en cada tubo *ependorf* y conservar a -80°C hasta su uso.

Las células Ca^{2+} competentes son viables por un período máximo de 1 mes.

Anexo 6

Composición del medio Luria Bertani (LB) Invitrogen®

Líquido

20 g de LB BROTH BASE por 1 L de agua destilada

Sólido

32 g de LB agar por 1 L de agua destilada

Esterilizar a 121°C por 30 min en autoclave.

Anexo 7

Antibióticos de selección

Cloranfenicol 34 mg/mL

Kanamicina 54 mg/mL

Anexo 8

PCR de colonia

PROCEDIMIENTO

1.- La mezcla de reacción contiene 10 μ M de cada oligonucleótido, 10 mM del mix de dNTP's (Invitrogen®), 50 mM de $MgSO_4$, 1 U de la polimerasa de alta fidelidad, buffer PCR 1X y al final colocar las células que transformadas. Llevar a un volumen final de 25 μ L.

2.- La reacción de amplificación se coloca en el termociclador y se programa con un calentamiento inicial a 94°C por lapso de 10 minutos, seguido por 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 63°C por 30 segundos y 68°C por 30 segundos, por último se continua por con un periodo de extensión final a 68°C por 10 minutos.

3.- Analizar las muestras por medio de un gel de agarosa 1%.

Anexo 9

Minipreparación por kit Qiaprep (purificación de DNA plasmídico)

PROTOCOLO

1-5 mL de cultivo previamente crecido durante 12 horas.

1.- Resuspender el pellet de células en 250 μ L de buffer P1 y transferir a un tubo para microcentrífuga.

2.- Adicionar 250 μ L de buffer P2 y mezclar por inversión seis veces. La apariencia de la solución debe ser homogénea.

3.- Agregar 350 μ L del buffer N3 y mezclar inmediatamente por inversión. La mezcla deberá lucir turbia.

4.-Centrifugar por 10 minutos a 13, 000 rpm a 4°C. Posteriormente colocar el sobrenadante en la columna y nuevamente centrifugar 1 minuto a 13, 000 rpm a 4°C. Descartar el sobrenadante.

5.- Adicionar a la columna 500 μ L de buffer PB y centrifugar por 1 minuto a 13, 000 rpm a 4°C. Descartar el sobrenadante.

6.- Lavar la columna con 750 μ L de buffer PE, centrifugar por 1 minuto y retirar el sobrenadante. Repetir este paso una vez más.

7.- Colocar la columna en un tubo nuevo y eluir el contenido de la columna con 100 μ L de agua estéril. Esperar 1 minuto y centrifugar. Conservar el sobrenadante a -20°C.

Anexo 10

Almacenamiento de células en glicerol 15%

PROCEDIMIENTO

- 1.- Se estría la colonia requerida en una caja que contiene medio LB agar con sus antibióticos de selección (en caso de ser necesario).
- 2.- Crecer a 37°C durante 12 horas.
- 3.- Posteriormente, seleccionar una sola colonia e inocular 1-2 mL de LB con su respectivo antibiótico y crecer 6-8 horas.
- 4.- Mezclar 850 µL de cultivo con 150 µL de glicerol y transferirlo a un criovial.
- 5.- Almacenar a -80°C.

Anexo 11

Electroforesis de proteínas

SOLUCIONES SDS-PAGE

Poliacrilamida 30% (500 mL)

142.5 g Poliacrilamida

7.5 g Bispoliacrilamida

Almacenar a 4°C

Buffer TRIS-HCl 1.5 mM pH 8.8 (500 mL)

90.855 g Tris BASE

Aforar a 500 mL con agua destilada

Regular pH con HCl

SDS 10% (10 mL)

1 g SDS

Aforar a 10 mL con agua destilada

PSA 10% (1 mL)

0.1 g Persulfato de amonio

Aforar a 1 mL con agua destilada

Almacenar a -20°C

Buffer corrida 10X (500 mL)

15.1 g Tris BASE

72 g Glicina

5 g SDS

Aforar a 500 mL con agua destilada

Buffer carga Laemmli (10 mL)

2.5 mL Tris 1M pH 8.8

2.8 mL Glicerol

0.025 g Azul de Bromofenol

2 mL SDS 2%

Aforar a 10 mL con agua destilada

Gel desnaturizante al 10% (10 mL) 1.5 mm		
Solución	Gel separador (mL)	Gel concentrador (mL)
Agua MQ	4.100 mL	1.500 mL
Poliacrilamida	3.300 mL	0.330 mL
Buffer Tris-HCl 1.5 mM	2.500 mL	0.630 mL
SDS 10%	0.100 mL	0.025 mL
APS	0.050 mL	0.015 mL
TEMED	0.008 mL	0.006 mL

Gel desnaturalizante de gradiente 4-20% (10 mL) 1.5 mm			
Solución	Gel separador 4 % (mL)	Gel separador 20% (mL)	Gel concentrador (mL)
Agua MQ	3.300 mL	0.410 mL	1.500 mL
Poliacrilamida	0.730 mL	3.360 mL	0.330 mL
Buffer Tris-HCl 1.5 mM	1.380 mL	1.380 mL	0.630 mL
SDS 10%	0.055 mL	0.055 mL	0.025 mL
APS	0.024 mL	0.024 mL	0.015 mL
TEMED	0.005 mL	0.003 mL	0.006 mL

Gel nativo de gradiente 4-20% (10 mL) 1.5 mm			
Solución	Gel separador 4 % (mL)	Gel separador 20% (mL)	Gel concentrador (mL)
Agua MQ	3.083 mL	0.417 mL	1.500 mL
Poliacrilamida	0.666 mL	3.333 mL	0.335 mL
Solución 2*	1.250 mL	1.250 mL	0.500 mL
APS	0.025 mL	0.025 mL	0.002 mL
TEMED	0.005 mL	0.003 mL	0.003 mL

*Solución 2 (mL)

25 mL 1.5 M Tris-HCl pH 8.8

8 µL EDTA 2 mM

Anexo 12

Tinción de Coomassie coloidal 0.06%

SOLUCIONES

Solución de fijado (500 mL)

Metanol 50%

Ácido fosfórico 2%

Aforar a 500 mL con agua destilada

Solución de hidratación (1 L)

Metanol 33%

Sulfato de amonio 17%

Ácido fosfórico 3%

Solución de tinción 0.06% (100 mL)

0.06 g de azul de Coomassie G-250

Aforar a 100 mL con la solución de hidratación

PROCEDIMIENTO

- 1.-Colocar el gel en un recipiente y adicionar 40 mL de solución de fijado e incubar 3-12 horas con agitación constante.
- 2.- Realizar tres lavados con agua destilada durante 10 minutos.
- 3.- Transferir el gel a un recipiente y agregar 40 mL de la solución de hidratación e incubar durante 1 hora.
- 4.- Teñir el gel con la solución de tinción durante 12 horas.

Anexo 13

Western blot

SOLUCIONES

Buffer de transferencia Towbin (1 L)

5.8 g Tris BASE

2.9 g Glicina

200 mL Metanol

3.7 mL SDS 10%

Rojo de Ponceau (10 mL)

0.05 g Ponceau xilidina

0.500 mL Ácido acético glacial

Aforar con agua destilada

Buffer de fosfatos (PBS) 20X pH 7.5 (500 mL)

81.81 g NaCl

3.86 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

10.22 g NaH_2PO_4

Aforar con agua destilada

Solución de bloqueo (30 mL)

1.25 g Gelatina Porcina Invitrogen®

30 mL PBS 1X

Solución de lavado (30 mL)

PBS 1X

Solución anticuerpo primario 1:1000 (10 mL)

10 mL PBS 1X

0.1 g Gelatina porcina

10 μ L Anticuerpo policlonal anti-His tag producido en ratón.

Solución anticuerpo secundario 1:10,000 (20 mL)

20 mL PBS 1X

0.2 g Gelatina porcina

2 μ L Anticuerpo secundario IgG de ratón asociado a fosfatasa alcalina

Buffer AP (100 mL)

1.21 g Tris BASE

0.58 g NaCl

1.51 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$

Aforar con agua destilada

Solución de revelado (10 mL)

66 μ L NBT 50 mg/mL

33 μ L BCIP 50 mg/mL

Aforar con buffer AP 1X

PROTOCOLO

1.- Correr la proteína a analizar en un gel de poliacrilamida desnaturalizante 10% por duplicado. Uno de los geles teñirlo con la tinción de Coomassie coloidal 0.06%.

Transferencia

2.- Humedecer la membrana de nitrocelulosa y el papel filtro con el buffer de transferencia.

3.- Equilibrar el gel por 15 minutos en buffer Towbin.

4.- Colocar el papel humedecido en la placa de transferencia evitando la formación de burbujas y posteriormente colocar la membrana de nitrocelulosa evitando tocarla.

5.- Poner el gel encima de la membrana sin que se formen burbujas y colocar el segundo papel filtro.

6.- Colocar la tapa de la cámara de transferencia y correr por 30 minutos a 10 volts.

- 7.- Transcurrido el tiempo retirar la membrana y teñirla con la solución de rojo de Ponceau para visualizar la transferencia de las proteínas.
- 8.- Lavar la membrana hasta eliminar todo el colorante.
- 9.- Lavar nuevamente la membrana con PBS 1X por 10 minutos.
- 10.- -Incubar la membrana con la solución de bloqueo durante toda la noche con agitación constante.
- 11.- Lavar 3-4 veces la membrana con PBS 1X durante 5 minutos cada lavado.
- 12.- Incubar la membrana con la solución que contiene el anticuerpo primario durante 8 horas a temperatura ambiente con agitación constante.
- 13.- Lavar la membrana 4-5 veces durante 5 minutos con la solución de lavado.
- 14.- Incubar la membrana con la solución del anticuerpo secundario durante 2 horas en agitación constante.
- 15.- Lavar nuevamente con la solución de lavado durante 5 minutos. Repetir este paso 4-5 veces.
- 16.- Continuar con 2 lavados con el buffer AP durante 5 minutos.
- 17.- Agregar la solución de revelado a la membrana y dejar reaccionar de 5-10 minutos.
- 18.- Detener la reacción con agua destilada y dejar secar la membrana.

Anexo 14

Purificación por cromatografía de afinidad por níquel (Ni-NTA, Invitrogen®)

SOLUCIONES

Buffer de unión pH 8 (NPI-10)

NaH₂PO₄ 50 mM

NaCl 300 mM

Imidazol 10 mM

Buffer de lavado pH 8 (NPI-20)

NaH₂PO₄ 50 mM

NaCl 300 mM

Imidazol 20 mM

Buffer de elución pH 8 (NPI-500)

NaH₂PO₄ 50 mM

NaCl 300 mM

Imidazol 500 Mm

PROCEDIMIENTO

a) Preparación del lisado celular

- 1.- Recuperar las células de *E. coli* de la expresión por centrifugación a 7,000 rpm por 25 minutos a 4°C. Resuspender el pellet en 30 mL de buffer de unión NPI-10.
- 2.- Incubar en hielo. Sonicar la muestra manteniéndola en hielo con 10 pulsos de 10 segundos a una amplitud de 30-35% con descansos de 10 segundos.
- 3.- Centrifugar a 7,500 rpm por 35 minutos a 4°C. Conservar la fracción soluble.

b) Preparación de la columna de Ni-NTA

- 1.- Mezclar la resina de Ni-NTA por inversión suave.
- 2.- Tomar 1.5 mL de la resina por cada 10 mL de fracción soluble y colocarla en la columna.
- 3.-Dejar asentar la resina y retirar el sobrenadante.
- 4.- Añadir 6 mL de buffer nativo de unión NPI-10. Dejar asentar la resina y retirar sobrenadante.

5.- Resuspender la resina en 6 mL de agua destilada. Permitir que la resina se asiente y retirar el sobrenadante. Repetir los pasos 4 y 5 una vez más a 4°C y retirar el sobrenadante.

c) Purificación de la proteína recombinante

1.- Colocar la fracción soluble que contiene la proteína de interés en la columna de purificación previamente preparada.

2.- Dejar unir la proteína durante 4 horas a 4°C con agitación constante.

3.- Transcurrido el tiempo, permitir que se asiente la resina y retirar el sobrenadante. Conservar la fracción a 4°C.

4.- Lavar la resina con 8 mL del buffer de lavado NPI-20 y retirar sobrenadante. Realizar este paso una vez más conservando ambas fracciones.

5.- Recuperar la proteína con 8 mL de buffer de elución NPI-500 y repetir el paso nuevamente. Conservar las fracciones.

Anexo 15

Cuantificación de proteínas por el método de Bradford.

REACTIVOS Y SOLUCIONES

Stock de Albúmina Bovina Sérica (BSA) 2 mg/mL

Agua destilada estéril

Colorante Bio-Rad protein assay solution®

PROCEDIMIENTO

1.- Colocar en tubos de vidrio:

Blanco: 1000 μ L agua destilada

Muestras: 980 μ L agua destilada

20 μ L de muestra (dilución 1:50)

2.- Agregar 300 μ L del reactivo de Bradford.

3.- Mezclar suavemente y reposar 15 minutos.

4.- Leer absorbancias en el espectrofotómetro a 595 nm.

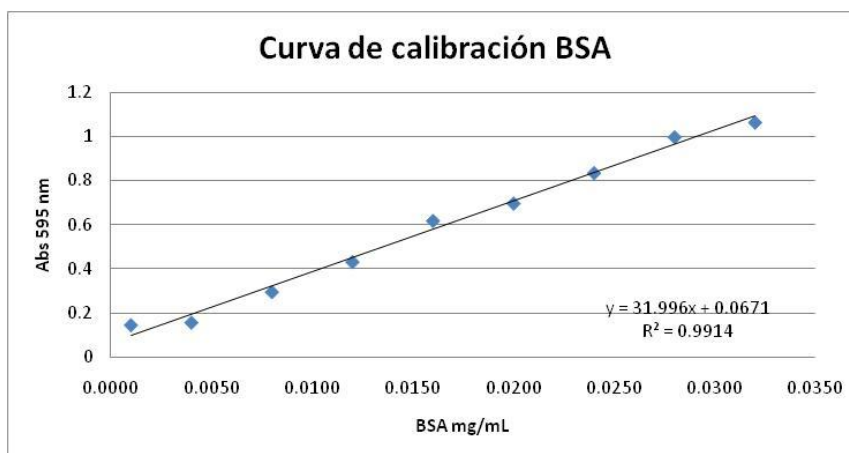
5.- Calcular la concentración de la muestra de acuerdo a una curva estándar de BSA y a la fórmula $y = m \cdot x + b$.

Donde y = absorbancia de la muestra

m = pendiente de la curva estándar

b = ordenada al origen

x = la concentración de proteína total en la muestra



Anexo 16

Ensayo enzimático NADH-acoplado para medir la actividad asparaginasa

MEZCLA DE REACCIÓN

Reactivo	Concentración/ cantidad	Concentración final (1mL reacción)
MAD (Malato Deshidrogenasa)	100 uL	3.5 U
GOT (Glutamato oxalacetato transaminasa)	352 uL	2.5 U
α -cetoglutarato	13.5 mg	3 mM
Buffer de fosfatos 42 mM, pH 7.2		42 mM
*Aforar a 25 mL con el buffer		
NADH	Sol. stock 0.1M	0.135 mM
L-asn (L-asparagina)	Sol. Stock 0.2M	10 mM

Blanco (1 mL):

50 uL H₂O

900 uL de la mezcla de reacción

50 uL de la solución stock de L-asn

Muestra (1mL):

H₂O, la correspondiente

900 uL de la mezcla de reacción

50 uL de la solución stock de L-asn

1.35 uL NADH

3-10 nM de asparaginasa recombinante pura

Control negativo (1 mL):

95.7 uL H₂O

900 uL de la mezcla de reacción

1.35 uL NADH

3 uL de asparaginasa recombinante pura

PROCEDIMIENTO

- 1.- Colocar los tubos en el termomixer a 37°C por 30 minutos para equilibrar la reacción.
- 2.- Calibrar el espectrofotómetro con el blanco a una absorbancia de 339nm a 37°C con agitación constante.
- 3.-Leer las muestras durante 5-20 minutos con la concentración a 2, 4, 6, 8 y 10 nM de enzima pura.
- 4.- Determinar la velocidad de reacción para cada concentración de enzima. Conservar la mezcla reacción a 4°C, es estable por 2 semanas. Las soluciones stock de NADH y de L-asn se preparan al momento de realizar el ensayo.