



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO EL HOMBRE Y SU AMBIENTE
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

Expresión heteróloga del gen de una vanadio haloperoxidasa (VHPO) hipotética de la especie de alga *Fucus distichus*

QUE PRESENTA EL ALUMNO (A)

Alvarado García Gustavo Alonso

Matrícula: 2142029929

**Proyecto: Caracterización y evaluación de los efectos a nivel fisiológico
de sustancias provenientes de recursos naturales de origen vegetal.**

Lugar de realización: Instituto de Biotecnología UNAM

ASESORES

Externo: Dra. Marcela Ayala Aceves (Instituto de Biotecnología UNAM)

Número de Cédula: 2484341

Interno: Dra. María Jesús Ferrara Guerrero (UAM-X)

Número Económico: 22662

Fecha de realización: 01/Septiembre/22 – 1/Marzo/23

Índice

| | |
|---|----|
| 1. Introducción..... | 1 |
| 2. Justificación..... | 2 |
| 3. Objetivos..... | 2 |
| Objetivo general..... | 2 |
| Objetivos específicos..... | 2 |
| 4. Marco teórico..... | 3 |
| El vanadio en la naturaleza..... | 3 |
| Química del vanadio..... | 3 |
| Presencia de vanadio en organismos marinos..... | 5 |
| El vanadio en las enzimas: haloperoxidasas..... | 7 |
| Purificación de proteínas..... | 8 |
| Amortiguador..... | 8 |
| Purificación de la preparación enzimática..... | 9 |
| 5. Estrategia experimental..... | 9 |
| 6. Materiales y métodos..... | 10 |
| Producción de células electrocompetentes de <i>Escherichia coli</i> | 10 |
| Electroporación y clonación del plásmido VHPO..... | 11 |
| Pre-inóculo VHPO y pET28 a (+)..... | 12 |
| Expresión de VHPO y pET28 a (+)..... | 12 |
| Obtención del paquete celular (pellet)..... | 12 |
| Tratamientos de lisis celular..... | 13 |
| Replegamiento de VHPO y extracto del cultivo recombinante por diálisis.. | 13 |
| Cuantificación de proteína..... | 13 |
| Evaluación cuantitativa de la actividad enzimática de VHPO..... | 13 |
| Electroforesis SDS-PAGE..... | 14 |
| 7. Resultados y discusión | 15 |
| Determinación de concentración de proteína total..... | 15 |
| Cinética de crecimiento de cultivo..... | 15 |
| Perfil de expresión..... | 16 |
| Diálisis..... | 17 |
| 8. Conclusiones y perspectivas..... | 18 |
| 9. Bibliografía..... | 20 |

1. Introducción

Las haloperoxidasas dependientes de vanadio (VHPO, por sus siglas en inglés) catalizan específicamente la oxidación de dos electrones de un haluro para generar los correspondientes ácidos hipohalosos (Wever *et al.* 2018). Estas enzimas están involucradas en la biosíntesis de compuestos orgánicos halogenados. Únicamente las cloroperoxidasas (VCPO) y las bromoperoxidasas (VBPO) se han caracterizado estructuralmente, principalmente a partir de especies eucariotas (Fournier *et al.* 2014).

Los compuestos halogenados tienen diversas funciones biológicas en la naturaleza, que van desde la defensa química hasta la señalización. La halogenación (es decir, la yodación, la bromación o la cloración) es una estrategia eficaz utilizada para aumentar la actividad biológica de los metabolitos secundarios e involucra enzimas halogenantes diferentes (Fournier *et al.* 2014).

Las haloperoxidasas (EC 1.11.1.10 The Comprehensive Enzyme Information System, BRENDA, 2019) son un miembro de la subfamilia oxidorreductasa peroxidasa, que catalizan la oxidación *in vitro* de los haluros utilizando peróxido de hidrógeno generalmente en presencia de grupos prostéticos como el hemo o iones de vanadio. Son de interés industrial y farmacéutico debido a su capacidad para halogenar compuestos como acetogéninas (actividad antimicrobiana) e indoles (actividades antiinflamatorias y anticancerígenas) (Butler. 1998; Coupe *et al.* 2007). Agregando a esto, se ha demostrado que las haloperoxidasas halogenan flavanonas, terpenos, diversos compuestos aromáticos y alquenos (Vazquez Duhalt *et al.* 2001). Debido a su mayor estabilidad, las haloperoxidasas dependientes de vanadio (VHPO) son de particular interés para su expresión y caracterización bioquímica.

La primer VHPO fue descubierta hace 30 años en el alga parda *Ascophyllum nodosum* (Vilter 1984). A partir de este descubrimiento, los estudios estructurales y cinéticos se han centrado en dos tipos de VHPO eucariotas: VCPO del hongo patógeno *Curvularia inaequalis* (Wever 1996; Fournier *et al.* 2014) y VBPO de *Ascophyllum nodosum* (Weyand *et al.* 1999; Fournier *et al.* 2014). No obstante, el análisis de las secuencias eucariotas que se encuentran en la base de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/prokhits.cgi), sugiere la presencia de una VHPO en el

genoma de *Fucus distichus* (alga café), que comparte el 86% de identidad con la VHPO de *A. nodosum*. Esta última se distingue por su capacidad de halogenar moléculas orgánicas en medios no acuosos o con altos porcentajes de solventes (Latham *et al.* 2017).

El presente trabajo de investigación se centra en explorar la expresión de la VHPO hipotética de *Fucus distichus* de manera heteróloga en *Escherichia coli* BL21 (DE3), modificando algunas de las variables que se conoce que pueden ayudar a mejorar la expresión de proteínas recombinantes.

2. Justificación

Diversos compuestos naturales están halogenados y las enzimas que llevan a cabo estas reacciones se han caracterizado y utilizado en reacciones biocatalíticas para la síntesis de nuevos fármacos y/o intermediarios relevantes para el área médica. En la actualidad, aproximadamente el 20 % de todos los productos farmacéuticos son halogenados (Jacob y colaboradores, 2014). Debido a que es difícil llevar a cabo reacciones de halogenación utilizando rutas químicas convencionales, las halogenasas representan biocatalizadores importantes en la industria farmacéutica.

3. Objetivos

Objetivo general

- Establecer las condiciones de expresión heteróloga del gen de una vanadio haloperoxidasa (VHPO) hipotética del alga *Fucus distichus*.

Objetivos específicos

1. Trasformar con el gen de la vanadio haloperoxidasa hipotética de *Ficus distichus* la cepa *E. coli* BL21 (DE3).
2. Establecer las condiciones para la expresión de la enzima de manera recombinante en *E.coli*.
3. Conocer las condiciones óptimas de reacción de la enzima expresada.

4. Marco teórico

El vanadio en la naturaleza

En la corteza terrestre, el vanadio es el vigésimo segundo elemento en abundancia (0.013% p/p) y es, por lo tanto, más abundante que el zinc y el cobre. En las aguas de mar, la concentración media de vanadio, presente fundamentalmente como (vanadato) NaH_2VO_4 , es del orden de 30 nM, constituyéndose en el segundo elemento de transición más abundante en entornos marinos, superado únicamente por el molibdeno (ca. 100 nM de molibdato(VI)) (Baran 2017). En la naturaleza, el vanadio no se encuentra en forma pura, por sus propiedades intrínsecas propenso a reaccionar con otros elementos (Rodríguez Mercado y Altamirano Lozano 2006).

Química del vanadio

El vanadio es un metal de la primera serie de transición, ubicado en el grupo 5 de la Tabla Periódica de los Elementos. Su número atómico es $Z = 23$ y su estructura electrónica $[\text{Ar}] 3d^3 4s^2$. Posee dos isótopos naturales estables: ^{50}V (con una abundancia de 0.25%) y ^{51}V (con una abundancia de 99.75%). Su peso atómico es de 50.9414. Su radio metálico es de 1.34 Å y su densidad es 6.11 g/cm³, su punto de fusión es de 1919 °C y el de ebullición 3400 °C (Baran, 2017).

La química de coordinación de este elemento ha recibido especial atención desde el descubrimiento de organismos vivos con concentraciones inusualmente altas de vanadio. En los seres humanos la concentración intracelular de vanadio es de 0.3 μM (Rehder 2012; Contreras Cadena et al 2014). Existen otros organismos que acumulan principalmente vanadio. (Brand et al., 1989) Los tunicados son organismos marinos que pueden llegar almacenar en sus células sanguíneas hasta una concentración de vanadio de 1.0 M (Guevara García 1996).

Es de sumo interés conocer la naturaleza de los sistemas biológicos en los que se encuentra este metal y la función que desempeña (Crans 2004; Tracey et al. 2007) (Contreras Cadena et al. 2014).

En la biosfera, el vanadio se encuentra en mayor proporción en la flora y fauna marina, aunque alcanza una importante concentración en hongos y otras especies terrestres. En el caso de los hongos las especies del género *Amanita* muestran una sorpresiva elevada capacidad de acumulación del elemento, habiéndose reportado concentraciones de hasta 325 mg/Kg de masa seca para la especie *A. muscaria* (Guevara García 1996; Baran 2008; Baran 2017). El hombre obtiene este elemento a partir de alimentos como (en orden de concentración creciente) carnes, leguminosas, cereales, hígado, pescado, espinacas, hongos, ostras, calamares (Myron *et al.*, 1978); Guevara García 1996). Se ha observado que en el plasma del ser humano existe una concentración promedio de vanadio del orden de 200 nM mientras que en los tejidos conjuntivos es ligeramente elevado. La mayor acumulación del elemento se da habitualmente en los huesos, pero también en el hígado y el riñón. De todas formas, los requerimientos dietarios parecen ser extremadamente bajos, probablemente en torno a los 10µg diarios (Baran 2017).

El vanadio posee seis estados de oxidación que van desde -3 a +5, siendo +3, +4 y +5 los que tienen actividad biológica (Contreras Cadena, 2014), aunque el estado +3 es poco abundante. El vanadio es capaz de formar complejos con número de coordinación desde 4 hasta 8, con distintas geometrías (Imagen 1).

Las especies de vanadio que predominan en condiciones fisiológicas son los iones vanadato (VO_4^{3-}) y vanadilo (VO^{2+}). Desde luego, también se encuentran presentes otras especies, debido a la aparición de equilibrios de protonación (reacción conocida como disociación en el contexto de las reacciones ácido-base) y de oligomerización que ocurren simultáneamente en disolución acuosa, en una proporción que depende del pH y de la concentración total de vanadio (Crans *et al.*, 1989, tomado de Guevara García 1996).

Los compuestos de coordinación de vanadio presentan comúnmente geometría octaédrica, de pirámide cuadrada o de bipirámide cuadrada (véase la Imagen 1), con un átomo de oxígeno que forma un doble enlace con el catión V^{4+} o V^{5+} (Vilas Boas 1987). Este oxígeno se conoce como “oxo” y a los compuestos se les denomina oxovanadilos u oxovanadatos, según sea su estado de oxidación. Otra estructura posible es la de bipirámide trigonal, que es un análogo estructural y electrónico (cuando el vanadio es V^{5+} y los sustituyentes son oxígenos) del intermediario de la reacción de hidrólisis de fosfato, de ahí que el vanadato

pueda enlazarse a las enzimas que hidrolizan trifosfato de adenosina (ATP) y, debido a que es mucho más estable que el fósforo en esta estructura bipiramidal, “congela” el estado de transición en la enzima inhibiendo su actividad (Guevara García 1996).

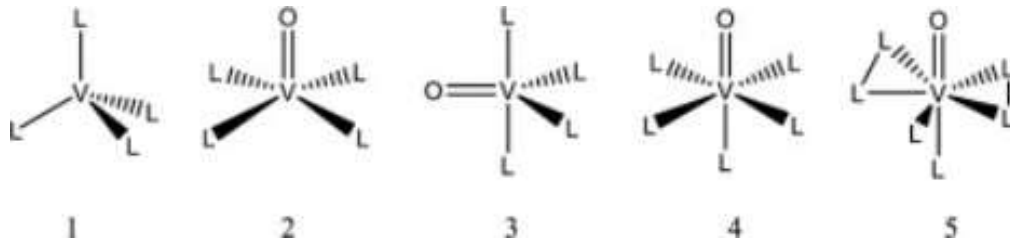


Imagen 1. Geometría de algunos compuestos de vanadio: 1) tetraedro, 2) pirámide de base cuadrada, 3) bipirámide trigonal, 4) octaedro, 5) bipirámide pentagonal (modificado de Martins, 2000, tomado de Contreras Cadena 2014).

El vanadio (V) existe principalmente como anión vanadato (VO_4^{3-}) (Imagen 2a), (Michibata 2012). Es estable entre pH 1 y 10, y se asimila en los organismos mediante el sistema de transporte de aniones fósforo (Guil 2010). El anión vanadato es isoestructural al anión fosfato (Imagen 2), por lo que diversas enzimas lo reconocen como tal, introduciéndolo a los procesos metabólicos del cuerpo; por ejemplo, la ATP-sintasa incorpora el vanadio al ADP formando ADP-V (Goodno 1979; Contreras Cadena, 2014 *et al.*).

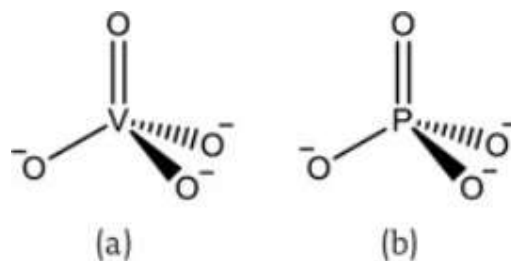


Imagen 2. Semejanzas estructural y electrónica entre los aniones vanadato (a) y fosfato (b) (Tomado de Contreras Cadena, 2014).

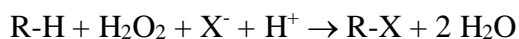
Presencia de vanadio en organismos marinos

En el océano habitan unos animales llamados tunicados, nombrados así porque la pared de su cuerpo semeja una túnica constituida por una sustancia celulósica llamada tunicina. El fisiólogo alemán Martin Henze (1911) descubrió que en las células sanguíneas de los tunicados llamadas vanadocitos (Smith, 1989; Taylor, 1997) se encuentran concentraciones de vanadio 100 millones de veces superiores a las del agua de mar, de la cual extraen su

alimento (Contreras Cadena, 2014).

Los tunicados son secuestradores del vanadio (V) proveniente del agua de mar en forma de H_2VO_4^- lo almacenan en los vanadocitos en forma de vanadio (III). Sin embargo, el vanadio (III) es solamente estable a un pH inferior a 2, por lo que una H^+ -ATP-asa se encarga de introducir protones a dichas células (Ochiai, 2008). Se cree que la función del vanadio en estos animales es la de intervenir en la síntesis de la túnica, la cual actúa como repelente de los posibles predadores, ya que cataliza la polimerización de las fibras de la tunicina (Rehder, 2012).

Otro descubrimiento interesante, y relativamente reciente, es la presencia de haloperoxidasas dependientes de vanadio en diversas especies de algas marinas, las que constituyen el primer ejemplo de enzimas claramente dependientes de este elemento (Baran 2008). Las haloperoxidasas están ampliamente distribuidas en la naturaleza y son capaces de catalizar una gran variedad de reacciones de acuerdo al siguiente esquema general (Baran 2017).



Históricamente, las haloperoxidasas se han nombrado en base al anión haluro (X^-) más electronegativo que son capaces de oxidar, esto es:

- cloroperoxidasas: Cl^- , Br^- , I^-

- bromoperoxidasas: Br^- , I^-

yodoperoxidasas: I^-

Las características del sitio activo han sido determinadas por cristalografía de rayos X en haloperoxidasas de diferentes orígenes. Como se muestra en la Imagen 3 el vanadio (V), está en un entorno trigonal-bipiramidal, unido a un átomo de N de un residuo de histidina en una de las posiciones axiales, mientras que la otra posición axial está ocupada por una molécula de agua o un grupo OH^- (dependiendo del valor del pH del medio). Las posiciones axiales están ocupadas por tres átomos de oxígeno (Baran 2017).

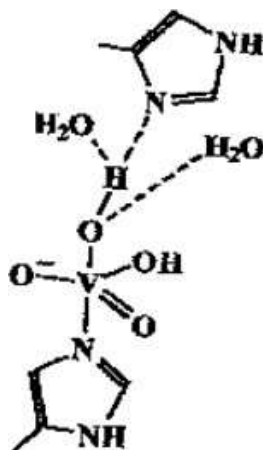


Imagen 3. Representación esquemática del sitio activo de las haloperoxidasas dependientes de vanadio.

El vanadio en las enzimas: haloperoxidasas

El vanadio (V) es el grupo prostético de la *vanadio haloperoxidasa* (VHPO), en algas, algunos hongos terrestres (*Phylum Hifomicetes*, clase Deuteromicetes) y en líquenes (Vilter 1984; Rehder 2012).

Vilter en 1984 fue el primero en demostrar la participación del vanadio en las vanadio-haloperoxidasas. Mostró que la bromoperoxidasa aislada de *Ascophyllum nodosum* era inactiva a pH 3.8 en un amortiguador de fosfato, lo cual fue explicado después al conocer que el vanadato era el grupo prostético de la bromoperoxidasa debido a que el ion fosfato es isoestructural e isoelectrónico al vanadato (Imagen 2) puede reemplazarlo en la enzima, inactivándola (Wever *et al.*, 1985; De Boer *et al.*, 1986 a y b). Las vanadio-cloroperoxidasas fueron detectadas años después en una familia de hongos terrestres (Van Schijndel *et al.* 1993; Vollenbroek *et al.*, 1995). El estado de oxidación del vanadio en la forma nativa de las haloperoxidasas es V^{5+} , que al reducirse conduce al estado V^{4+} , catalíticamente inactivo.

Las haloperoxidasas catalizan la oxidación de los halogenuros Cl^- , Br^- y I^- por el H_2O_2 a ácidos hipocloroso, hipobromoso e hipoyodoso, respectivamente. Estos ácidos (HOX^-) son liberados del sitio activo y pueden actuar sobre una variedad de compuestos orgánicos (R-H) que son susceptibles a ataques electrofílicos (sustitución nucleofílica, donde un par de electrones libres de un nucleófilo ataca un centro electrofílico y se enlaza a él, expulsando otro grupo denominado grupo saliente), conllevando a la formación de una gran diversidad

de compuestos halogenados (Contreras Cadena et al. 2014).

Purificación de proteínas

La purificación de una proteína es un prerequisite esencial para las diversas aplicaciones en biotecnología. Una purificación eficiente reside en la selección de las técnicas más adecuadas y en la optimización del proceso, de manera que se maximice el rendimiento minimizando el número de pasos requeridos. La mayoría de los esquemas de purificación implican alguna forma de cromatografía (Samaniego H., 2007).

La cromatografía es un método de separación de los constituyentes de mezclas por migración diferencial durante su paso a través de una columna cromatográfica. La separación se rige por la distribución de sustancias entre dos fases: la fase móvil y la fase estacionaria. La fuerza de la interacción resultante entre las moléculas de soluto y las moléculas de cada fase se determina por las propiedades físicas y químicas de las moléculas del soluto en el ambiente dado (Samaniego H., 2007).

Amortiguador

Las condiciones de la solución en la que se encuentra la proteína a lo largo de cada paso de purificación son esenciales para mantener la función y estabilidad de la proteína. Las proteínas deben mantenerse en soluciones con alta capacidad amortiguamiento para evitar cambios repentinos de pH que puedan afectar de manera irreversible su plegamiento, solubilidad y función (Coupe et al., 2007).

Un amortiguador es una solución que contiene un par conjugado ácido/base. El rango de pH de un amortiguador está dado por su pKa, definido como el pH en el cual el 50% de las moléculas se encuentran en su forma ácida y el otro 50% en su forma básica (UNAM, s.f)

Purificación de la preparación enzimática

Uno de los métodos de utilidad general para la purificación de proteínas es la cromatografía, la cual aprovecha las diferencias en carga, tamaño, afinidad de enlaces, etc. que hubiera en una mezcla de proteínas. Un material poroso sólido con propiedades químicas apropiadas

(fase estacionaria) se coloca dentro de una columna, y una solución amortiguada (fase móvil) pasa a través de ésta. La solución que contiene las proteínas se vierte por la parte superior de la columna y pasa a través de la matriz sólida. Las proteínas migran más rápido o más lento a través de la columna dependiendo de su interacción con la fase estacionaria, con lo que se logra su separación (Olvera García *et al.*, 2015).

Una regla general para las soluciones amortiguadoras es que el pH de la solución debe estar en un rango de más menos una unidad de pH respecto de su pKa para tener buena capacidad amortiguante. Esto asegura que haya suficientes moléculas tanto en su forma ácida como en su forma básica que permitan neutralizar el posible influjo de moléculas de H⁺ u OH⁻. Así, los amortiguadores previenen cambios de pH que podrían afectar la estructura de las proteínas y su actividad (Garritz *et al.*, 2005).

5. Estrategia experimental

Se obtuvo de una compañía el plásmido con la secuencia codificando para la VHPO hipotética de *Fucus distichus* clonada en el vector pET-28a, que tiene 5369 pb y codifica para la resistencia al antibiótico kanamicina, además posee una secuencia amino terminal que contiene His-Tag/trombina/T73Tag más una configuración adicional en el C-terminal el cual lleva una cola de histidinas para su purificación (Novagen, I. "pET system manual." 2000olvera).

De acuerdo a los objetivos específicos la estrategia experimental se presenta a continuación.

- 1.- Transformar *E. coli* con el vector que contiene el gen codificando para la enzima hipotética VHPO de *F. distichus*.



2.- Establecer las condiciones para la expresión de la enzima en *E. coli*



Estos objetivos se alcanzarán a través de la integración de las experiencias reportadas en la literatura para este tipo de enzimas y determinar las condiciones óptimas del cultivo y de purificación.

6. Materiales y métodos

Producción de células electrocompetentes de *Escherichia coli*

Se preparó 500 mL de medio 2xYT para la elaboración de más células electrocompetentes, se preparó un duplicado de pre-inóculo con 20 µL de las células *E. coli* BL21 (DE3) y se mezclaron en 5 mL de medio 2xYT, se dejaron en incubación a 200 rpm, 37 °C durante 14h. Posteriormente se inocularon 5 mL en 500 mL de medio 2xYT y se dejó crecer en las mismas condiciones hasta una OD 600nm 0.6. Una vez que alcanzó la densidad óptica deseada se dejó enfriar el cultivo en hielo. Los reactivos para preparar medio 2xYT se muestran en la Tabla 1.

| Tabla 1. Protocolo para preparar medio 2xYT líquido estéril, 1 L | |
|---|----------|
| Reactivos | Cantidad |
| Triptona | 16 g |
| Extracto de levadura | 10 g |
| Cloruro de sodio | 5 g |

El cultivo se centrifugó a 8000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. Se resuspendió el pellet en 250 mL de H₂O mili Q fría. Centrifugamos nuevamente 15 minutos a 8000 rpm a 4 °C. Se resuspendió de nuevo el pellet en 250 mL de H₂O mili Q fría. Repetimos centrifugando 15 minutos a 8000 rpm a 4 °C. A continuación, repetimos los pasos resuspender y centrifugación tres veces más. Una vez hecho esto se resuspendió en 30 mL de glicerol al 10% (preparado con H₂O mili Q). Se colocó en un tubo de centrifuga falcon de 50 mL y se centrifugó durante 15 minutos a 8000 rpm a 4 °C. Se vació el sobrenadante y se resuspendió el pellet con el líquido que se quedó en las paredes del tubo (se obtuvo una pasta de células). Medimos OD_{600nm} de la pasta. Una OD=100 corresponde a 3x10¹⁰ células/mL. Se hicieron 40 alícuotas de 50 µL por tubo y se metieron a congelar a -70 °C.

Electroporación y clonación del plásmido VHPO

Se tomó un µL de plásmido *Fucus distichus* (VHPO) y se adicionó a 50 µL de células de *Escherichia coli* BL21 (DE3) electrocompetentes y su respectivo control (pET28 a (+), se dejaron reposar la mezcla durante 20 minutos. Se tomaron los 51 µL de las células bacterianas más la reacción de ligación y se colocaron en una cubeta de electroporación de 0.2 mm. Posteriormente se aplicó un voltaje de 1.8 kV en un equipo de electroporación marca (Bio-rad). De inmediato se adicionaron 950 µL de medio LB líquido estéril para recuperar a las células transformadas. Se tomó todo el resto de las células transformantes, se colocaron en un tubo Eppendorf de 600 µL y se encubaron a 37 °C por 50 minutos en un Thermoblock BioShake IQ a scientific. Las células transformantes junto con el control y el blanco se sembraron 50 µL en placas de LB sólido con antibiótico kanamicina 50 µg / mL y se incubaron a 37 °C toda la noche. Los reactivos para preparar medio LB se muestran en

la Tabla 2.

| Tabla 2. Protocolo para preparar medio LB (Luria Bertani) líquido estéril, 1 L | |
|---|--------------|
| Reactivos | Pesar |
| NaCl | 10g |
| Triptona | 10g |
| Extracto de levadura | 10g |

Pre-inóculo VHPO y pET28 a (+)

De las colonias obtenidas de la transformación, se tomó la colonia más aislada para inocular por separado 5 mL de medio LB adicionado con kanamicina (50 µg/mL). Se prepararon duplicados de 5 mL de pre-inóculo de VHPO y pET28 a (+), se metieron a incubar a 200 rpm, a 37°C durante 14h.

Expresión de VHPO y pET28 a (+)

Se suministró 10 mL de pre-inóculo VHPO BL21 (DE3) en un litro de medio LB líquido en un matraz fernbach de 3 litros estéril. Así mismo se adicionó 1 mL de pre-inóculo pET28 BL21 (DE3) en 100 mL de medio LB en un matraz de 250 mL. Se incubaron a 200 rpm, 37 °C. Se añadió kanamicina (50 µg /mL) antes de la inoculación. La expresión de la proteína se indujo con Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) cuando la densidad óptica (OD)₆₀₀ alcanzó un valor de uno. Inmediatamente se adicionó al cultivo de un litro, un mililitro de IPTG 1M para una concentración final de 1mM y para el cultivo de 100 mL se adicionaron 100 µL de IPTG 1M para una concentración final de 1mM, se incubaron a 37 °C a 190 rpm por 4 h. Se midió densidad óptica durante cada hora durante ese periodo de tiempo.

Obtención del paquete celular (pellet)

Los cultivos se centrifugaron por 15 min a 8000 rpm. Se eliminó el sobrenadante (fracción soluble), el pellet (fracción insoluble) se congeló en hielo seco durante 20 minutos para su posterior análisis en un gel de electroforesis SDS-PAGE y se resguardó en el congelador a

4 °C.

Tratamientos de lisis celular

Se utilizó lisis celular para recuperar el extracto intracelular; primeramente la pastilla de células se descongeló en hielo. A partir de este paso se trabajó en frío (4 °C). Los cultivos se centrifugaron por 15 min a 8000 rpm. Se eliminó el sobrenadante, el pellet se resuspendió en 10 mL de amortiguador de carga (Tris 50mM pH 8.4). La muestra se sonicó en un equipo Ultrasonic Processor, por 1 minuto 20 repeticiones de pulsos de sonicación con 70% de amplitud y 10 s de pausa. Las muestras lisadas se centrifugaron 3 min a 13000 rpm. El sobrenadante se extrajo y se guardó la pastilla en refrigeración a 4 °C.

Replegamiento de VHPO y extracto del cultivo recombinante por diálisis

Los cuerpos de inclusión y sobrenadante de VHPO y extracto del cultivo recombinante se dializaron en 500 mL de amortiguador de acetatos 50 mM pH 7.8 en una membrana con un tamaño de poro con corte de 50 kDa; se dejó en el cuarto frío a 4 °C durante 24h. Las muestras se centrifugaron a (13,000 rpm, 3 min) el sobrenadante se analizó para determinar la concentración de proteína y la actividad de la haloperoxidasa.

Cuantificación de proteína

Las concentraciones de proteínas se determinaron mediante el método de Bradford (1976). Las mediciones espectrofotométricas se hicieron en un espectrofotómetro marca Agilent 8453 UV-Vis por triplicado. El cual se realizó un blanco antes de cada medición en el espectrofotómetro.

Evaluación cuantitativa de la actividad enzimática de VHPO

La actividad de la VHPO se evaluó controlando la bromación de la monoclorodimedona (MCD) espectrofotométricamente a 278 nm. El ensayo se llevó a cabo con amortiguador MES 50 mM pH 6.5, KBr 20 mM y MCD 0.1 mM. La reacción se inició mediante la adición de H₂O₂ 1 mM y se registró la disminución de la absorción de MCD durante 1 minuto.

El VHPO se dejó en agitación con Na₃VO₄ 1 mM durante la noche antes de los ensayos de actividad. Treinta microlitros de VHPO se usaron en el ensayo. Los resultados de la

actividad volumétrica se expresaron en U/mL, que representan la velocidad inicial de la reacción en términos de unidades de enzima (U=cantidad de enzima que cataliza la conversión de μmol de sustrato por minuto).

Electroforesis SDS-PAGE

La expresión de la proteína recombinante fue evaluada y analizada mediante SDS-PAGE, usando un marcador de peso molecular. Los reactivos del gel separador se mezclaron en orden descendente siguiendo el protocolo establecido en el laboratorio, la mezcla de los reactivos se colocó en el sándwich de cristal soportado por el marco y se le agregó etanol para eliminar burbujas de aire. Se dejó polimerizar por 30 min. Al finalizar la polimerización, se retiró el etanol. De la misma manera se hizo para el gel concentrador, los reactivos se mezclaron en orden y con esta solución se llenó el sándwich de cristal. Se colocó el peine con 10 greclas y la mezcla se dejó polimerizar por 30 min. Se tomaron 12 μg de proteína total y se adicionaron 10 μL de amortiguador de carga para proteínas y posteriormente, se incubaron a 90 °C durante 10 min. Para la separación de proteínas las muestras se cargaron en geles de poliacrilamida al 10 % en condiciones desnaturalizantes y se corrieron a 80 mV por 20 min y después a 120 mV por 2 h. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie y se revelaron con una solución reveladora (10% de ácido acético). Los reactivos se muestran en las Tablas 3 y 4.

| Tabla 3. Gel separador | |
|-------------------------------|--------------|
| Reactivo | Volumen (mL) |
| Agua | 4.0 |
| Tris pH 8.8 | 2.5 |
| Acrilamida | 3.3 |
| SDS | 0.1 |
| PSA | 0.1 |
| TEMED | 0.007 |

| Tabla 4. Gel concentrador | |
|----------------------------------|--------------|
| Reactivo | Volumen (mL) |
| Agua | 2.8 |
| Tris pH 8.8 | 0.5 |
| Acrilamida | 0.66 |
| SDS | 0.04 |
| PSA | 0.04 |
| TEMED | 0.007 |

7. Resultados y discusión

Determinación de concentración de proteína total

Las lecturas de la concentración de proteína VHPO se realizaron por triplicado a 595 nm, utilizando volúmenes de 5 μ L, 10 μ L y 5 μ L del control (pET28, vector vacío). La siguiente tabla muestra las respectivas concentraciones y absorbancias obtenidas.

| Plásmido | Concentración (μ g/mL) | Concentración de la muestra (considerando la disolución) (mg/mL) |
|-------------------|-----------------------------|--|
| VHPO (5 μ L) | 5.4 | 1.2233 |
| | 6.2 | |
| | 6.6 | |
| VHPO (10 μ L) | 10.1 | 1.01187 |
| | 10.6 | |
| | 9.5 | |
| pET28 (5 μ L) | 11.7 | 2.2211 |
| | 10.2 | |
| | 11.2 | |

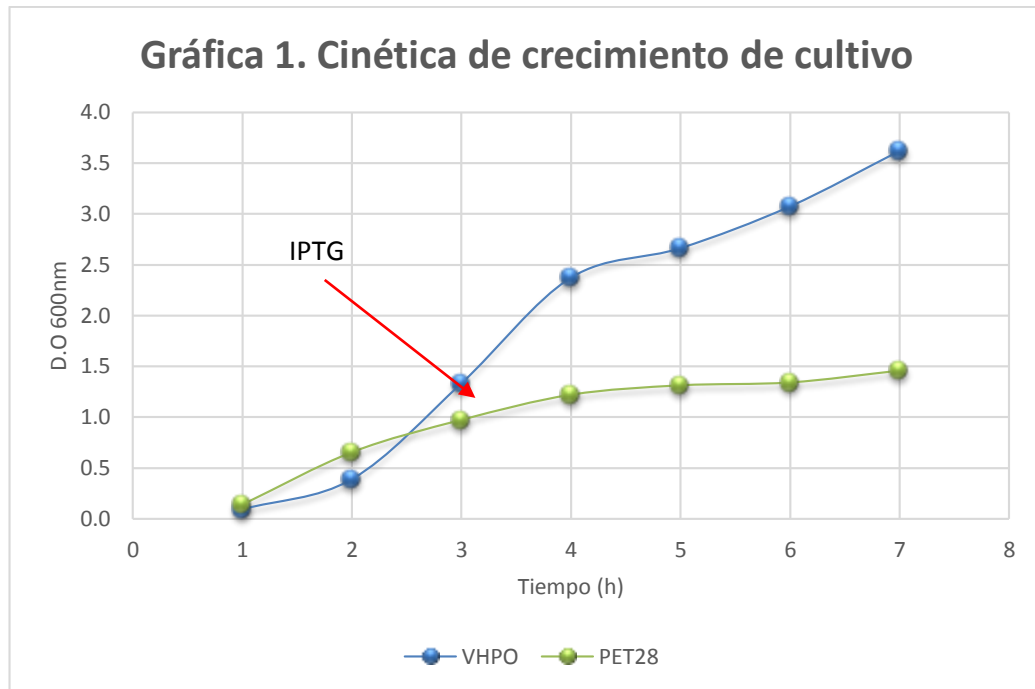
Cinética de crecimiento de cultivo

Para la evaluación de la actividad enzimática se usaron 30 μ L de VHPO, se midió la D.O durante 7 horas en intervalos de 1 hora. Los resultados se muestran en la siguiente tabla

| | | | Inducción IPTG | | | | |
|--------|-------|-------|----------------|-------|-------|-------|-------|
| Matraz | 1h | 2 h | 3 h | 4 h | 5 h | 6 h | 7 h |
| VHPO | 0.091 | 0.389 | 1.334 | 2.373 | 2.663 | 3.075 | 3.622 |
| PET28 | 0.139 | 0.654 | 0.972 | 1.219 | 1.312 | 1.340 | 1.457 |

Durante la tercera hora al alcanzar valores de D.O cercanos a uno se agregó IPTG (isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido) con concentración final de 1 mM para inducir la producción de la proteína recombinante, tenido su punto máximo a la séptima hora con valores de 3.622 y 1.457 para VHPO y pET28 respectivamente.

La gráfica 1 muestra un crecimiento exponencial para VHPO después de adicionar el IPTG mientras que el pET28 no tuvo un aumento significativo en su crecimiento microbiano.



Perfil de expresión

Los resultados de la electroforesis SDS-PAGE fueron teñidos y revelados mediante espectroscopia UV/vis. De acuerdo con el peso molecular del VHPO (62 kDa) en la Imagen 4 se observa que las líneas de las fracciones VHPOs y pET28s son más tenues y presentan coincidencia con el peso molecular de la proteína. Sin embargo, las líneas de las fracciones de VHPOp y pET28p no se perciben debido a que la concentración de proteínas es baja y de acuerdo con la tinción de Coomassie, esta es empleada para la determinación abundante de proteínas (Carrillo Soto, 2012).

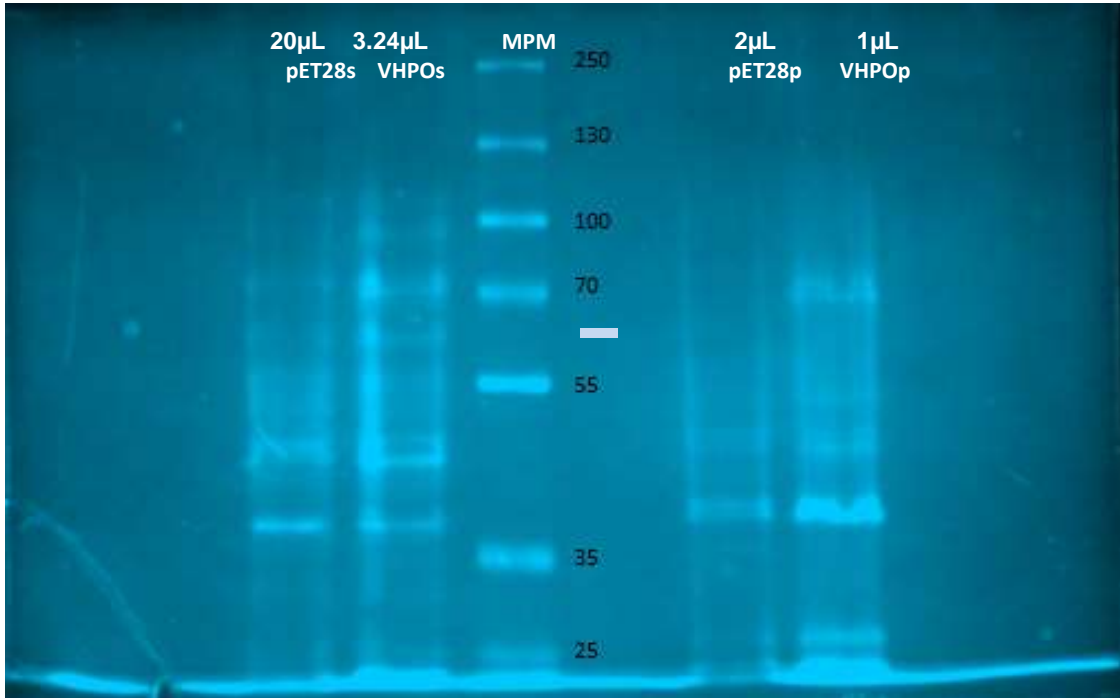


Imagen 4. Fracciones de pET28, VHPO y MPM (marcador de peso molecular), s: extracto celular, p: pellet. 12 µg de proteína, geles de poliacrilamida al 10 %, tinción con azul de Coomassie y revelado con solución de ácido acético al 10%.

Diálisis

El sobrenadante obtenido se analizó mediante electroforesis SDS-PAGE. La Imagen 5 muestra las fracciones *pET28* y *VHPO* en las cuales se puede apreciar que todas las líneas son nítidas y que los pesos moleculares coinciden con el peso de VHPO establecido.

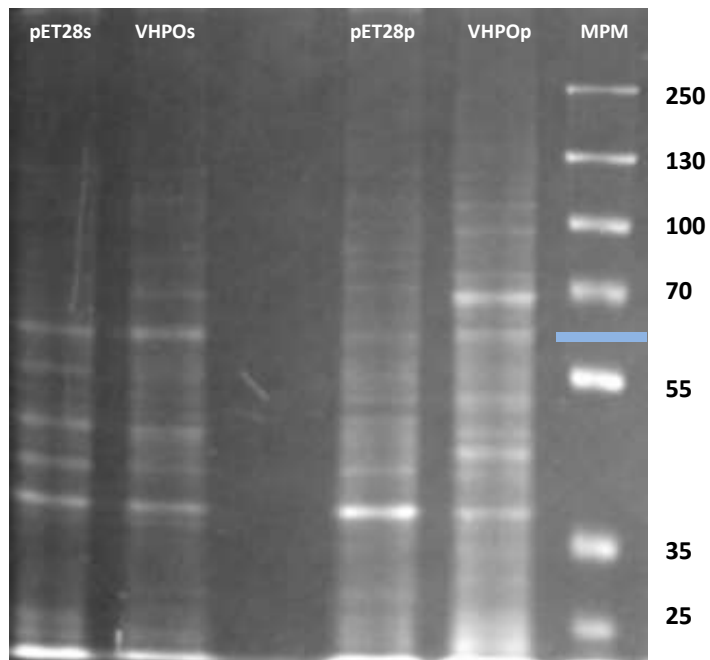


Imagen 5. Fracciones pET28, VHPO y MPM (marcador de peso molecular), s: extracto celular, p: pellet. 5 µg de proteína, geles de poliacrilamida al 10 %, tinción con azul de Coomassie y revelado con solución de ácido acético al 10%.

Como se aprecia en las imágenes 4 y 5, existe una banda en la fracción insoluble de los cultivos cerca de 70 kDa, que no está en el control (pET28). Es probable que esta banda corresponda a la proteína de interés, sin embargo, no se detectó actividad en el sobrenadante. Es frecuente que las proteínas de eucariotes expresadas en bacterias no se plieguen adecuadamente, sobre todo si contiene grupos prostéticos como en este caso el ion vanadato.

8. Conclusiones y perspectivas

Los resultados permiten concluir que la VHPO posiblemente se está expresando en el sistema heterólogo, sin embargo, la expresión heteróloga de proteínas en *E. coli* producen cuerpos de inclusión insolubles e inactivos con plegamiento incorrecto de la proteína (Coupe et al., 2007). Los resultados son prometedores y existen varias alternativas para continuar con el trabajo:

- 1.-Recuperar la parte insoluble y someterla a diferentes tratamientos de replegamiento en presencia del ion vanadato, que incluyen solubilizar toda la fracción con agentes caotrópicos como urea o cloruro de guanidina, y posteriormente ir reduciendo la concentración del desnaturalizante lentamente (por diálisis o dilución, por ejemplo) con el fin de dar tiempo suficiente a que se formen interacciones estabilizantes y la proteína se pliegue correctamente.
- 2.-Utilizar otros sistemas de expresión heteróloga, basados en microorganismos eucariotes como levaduras; por ejemplo: *Pichia pastoris*; debido a que esta levadura metilotrófica es un sistema de expresión más adecuado para la producción de proteínas recombinantes, ya que es rentable y posee la capacidad de realizar muchas de las modificaciones postraduccionales de eucariotas superiores (Westerholm P. et al, 2006).

Calendario de actividades

| <i>Actividades</i> | <i>Sep.</i> | <i>Oct.</i> | <i>Nov.</i> | <i>Dic.</i> | <i>Ene.</i> | <i>Feb.</i> | <i>Mar.</i> |
|---|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Búsqueda bibliográfica | X | | | | | | |
| Elaboración de protocolo | X | | | | | | |
| Preparación de medios de cultivos | | X | X | | | | |
| Preparación de cajas con medio LB y antibiótico. | | X | X | | | | |
| Preparación de soluciones amortiguadoras. | | X | X | | | | |
| Preparación de células electrocompetentes. | | X | X | | | | |
| Trasformación por electroporación de células <i>E. coli</i> BL21 (DE3): pFdist. | | X | X | | | | |
| Identificación de las colonias con el vector recombinante. | | X | X | | | | |
| Preparación de pre-inóculos. | | X | X | | | | |
| Inoculación de cultivos | | X | X | | | | |
| Siembra de colonias. | | X | X | | | | |
| -Esterilización de celdas | | X | X | | | | |
| -Zonicación | | X | X | | | | |
| Cinética de crecimiento de cultivo | | | | X | | | |
| Cuantificación de proteínas | | | | X | | | |
| Obtención del paquete celular | | | | X | | | |
| Determinar actividad enzimática volumétrica. | | | | X | | | |
| Producción de VHPO en alga <i>F. distichus</i> . | | | | X | | | |
| Ensayo de Monoclorodimedona. | | | | X | | | |
| Redacción de resultados, discusión y conclusión | | | | | X | X | |
| Entrega final | | | | | | | X |

9. Bibliografía

- Alfaro Dubón S. A. y Guzmán López, J. E. (2007). Diseño de una guía práctica para la preparación, conservación y correcto uso de soluciones amortiguadoras (Doctoral dissertation, Universidad de El Salvador). Brand, S. G., Hawkins, C. J., Marshall, A. T., Nette, G. W., & Parry, D. L. (1989). Vanadium chemistry of ascidians. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 93(2), 425-436.
- Baran E.J. (2008). Vanadium in plants, fungi and bacteria. In: *Advances in Plant Physiology* (H. Hemantaranjan, Editor). Scientific Publishers, Jodhpur India. vol. 10, pp. 357-372.
- Baran E.J. (2017). Vanadio: un nuevo elemento estratégico? Académico Titular de la Academia Nacional de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Tomo 69: 84-114.
- Bradford M.M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding". *Anal. Biochem.*72: 248- 252.
- Brand S.G., Hawkins C.J., Marshall A.T., Nette G.W. y Parry D.L. (1989). Vanadium chemistry of ascidians. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 93(2), 425-436.
- BRENDA in 2019: integrated reactions, kinetic data, enzyme function data, improved disease classification: new options and contents in BRENDA.
- Butler A. (1998) Acquisition and utilization of transition metal ions by marine organisms, *Science*, 281, 207–210.
- Carrillo Soto, J. G. (2012). Evaluación de procedimientos de tinción para el análisis de proteínas por electroforesis (SDS-PAGE).
- Contreras Cadena D. A., Gómez Pech, C., Rangel García, M., Ruiz Hernández, A., Martínez Bulit P. y Barba Behrens, N. (2014). La importancia del vanadio en los seres vivos. *Educación Química*, 25, 245-253.
- Coupe E. E., Smyth M.G., Fosberry A. P., Hall R. M. y Littlechild J. A. (2007).The dodecameric vanadium-dependent haloperoxidase from the marine algae *Corallina officinalis*: Cloning, expression, and refolding of the recombinant enzyme. *Protein Expression and Purification*, 52(2), 265-272.
- Crans D. C., Smee, J. J., Gaidamauskas E., y Yang L. (2004). The chemistry and biochemistry of vanadium and the biological activities exerted by vanadium compounds, *Chemical Reviews*, 104(2), 849
- De Boer E., Tromp M. G. M., Plat, H., Krenn G. E. y Wever R. (1986). Vanadium (V) as an essential element for haloperoxidase activity in marine brown algae: purification and characterization of a

vanadium (V)-containing bromoperoxidase from *Laminaria saccharina*, *Biochimica et Biophysica Acta*, 872, 104–115b.

- De Boer E., van Kooy Y., Tromp, M. G. M., Plat H. y Wever R. (1986). Bromoperoxidase from *Ascophyllum nodosum*: a novel class of enzymes containing vanadium as a prosthetic group, *Biochimica et Biophysica Acta*, 869, 48–53a.
- Fournier J. B., Rebuffet E., Delage L., Grijol R., Meslet L., Rzonca J y Leblanc C. (2014). The vanadium iodoperoxidase from the marine Flavobacteriaceae species *Zobellia galactanivorans* reveals novel molecular and evolutionary features of halide specificity in the vanadium haloperoxidase enzyme family. *Appl. Environ. Microbiol.*, 80 (24), 7561-7573.
- Garritz A., Gasque L. y Martínez A. (2005). Naturaleza de la Ciencia e Indagación en un Texto de Química Universitaria. Enseñanza de las Ciencias, (Extra).
- Goodno C. C. (1979). Inhibition of myosin ATPase by vanadate ion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(6), 2620-2624.
- Guevara García J. A. (1996). Una semblanza de la química bio-inorgánica del vanadio. *Educación Química*, 7(4), 185-189.
- Guil A. (2010). Tratado de Nutrición, Panamericana, España, Madrid. pp. 727-728
- Jacob, C., Kirsch, G., Slusarenko, A., Winyard, P. G., & Burkholz, T. (2014). Recent Advances in Redox Active Plant and Microbial Products.
- Latham J., Brandenburger E., Shepherd S.A., Menon B.R.K. y Micklefield J. (2017). Desarrollo de enzimas halogenasas para uso en síntesis. *Chemical Reviews*, 118, 232 – 269.
- Michibata H. (2012). Vanadium: Biochemical and Molecular Biological Approaches. Dordrecht: Springer, 228 p.
- Myron D. R., Zimmerman T. J., Shuler T. R., Klevay L. M., Lee D. E. y Nielsen F. H. (1978). Intake of nickel and vanadium by humans. A survey of selected diets. *The American journal of clinical nutrition*, 31(3), 527-531.
- Novagen I. (2005). pET system manual. PP. 34-41.
- Ochiai E. (2008). Bioinorganic chemistry. Oxford, England: Elsevier.
- Olvera García M., Serrano E. y Quirasco M. (2015). Detección de proteínas con actividad antibacteriana producidas por bacterias ácido lácticas. *BioTecnología*, 19 (1), 25-43.
- Rehder D. (2012). The potentiality of vanadium in medicinal applications. *Future Medicinal Chemistry*, 4(14), 1823-1837.

- Rodríguez Mercado J. J. y Altamirano Lozano M. A. (2006). Vanadio: contaminación, metabolismo y genotoxicidad. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 22(4), 173-189.
- Samaniego Hernández, M. (2007). Clonación, sobre-expresión y purificación de las proteínas NSP5 y NSP6 de rotavirus en *Escherichia coli*.
- Smith M. J. (1989). Vanadium biochemistry: the unknown role of vanadium-containing cells in ascidians (sea squirts), *Experientia*, 45, 452-457, 1989.
- Taylor S. W., Kammerer B. y Bayer E. (1997). New perspectives in the chemistry and biochemistry of the tunichromes and related compounds, *Chemical Reviews*, 97, 333-346,
- Tracey A. S., Willsky G. R., Takeuchi E. S. (2007). *Vanadium Chemistry, Biochemistry Pharmacology and Practical Applications*. Boca Raton, EUA: Taylor and Francis Group.
- UNAM (s.f). Fisiología del equilibrio ácido-base. Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina.
- Van Schijndel J. W., Vollenbroek E. G. y Wever R. (1993). The chloroperoxidase from the fungus *Curvularia inaequalis*; a novel vanadium enzyme. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1161(2-3), 249-256.
- Vazquez Duhalt R., Ayala M., Márquez Rocha F.J. (2001). Biocatalytic chlorination of aromatic hydrocarbons by chloroperoxidase of *Caldariomyces fumago*. *Phytochemistry*, (6) 929-933.
- Vilas Boas L.F. y Costa Pessoa G. A. (1987). Vanadium, and *Comprehensive Coordination Chemistry*, vol. 3, cap. 33, Sir Geoffrey Wilkinson (ed.), Pergamon Press, New York, pp. 453-583.
- Vilter H. (1984). Peroxidases from Phaeophyceae: a vanadium (V)-dependent peroxidase from *Ascophyllum nodosum*. *Phytochemistry*, 23(7), 1387-1390.
- Vollenbroek E. G. M., Simons L. H., van Schijndel J., Barnett P., Balzar M., Dekker H., van der Linden C. y Wever R. (1995). Vanadium chloroperoxidases occur widely in nature, *Biochemical Society Transactions*, 23, 267–271.
- Westerholm-Parvinen, A., Mattinen, M. L., Selinheimo, E. y Saloheimo, M. (2006). Expresión heteróloga de Trichoderma reesei tirosinasa 2 marcada isotópicamente en *Pichia pastoris*. *Fábricas de células microbianas*, 5, 1-1.
- Wever R. (1996). X-ray structure of a vanadium-containing enzyme: chloroperoxidase from the fungus *Curvularia inaequalis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93, pp. 392-396.
- Wever R., Krenn B. E., Renirie R. (2018). Haloperoxidasas dependientes de vanadio marino, su aislamiento, caracterización y aplicación. En: *Enzimas Marinas y Metabolismo Especializado – Parte*

B, vol. 605, cap. 6, p. 141-201.

- Wever R., Plat H. y De Boer E. (1985). Isolation procedure and some properties of the bromoperoxidase from the seaweed *Ascophyllum nodosum*, *Biochimica et Biophysica Acta*, 830, 181–186.
- Weyand M., Hecht H. J., Kiess M., Liaud M. F., Vilter H. y Schomburg D. (1999). Determinación de la estructura de rayos X de una haloperoxidasa dependiente de vanadio de *Ascophyllum nodosum* a una resolución de 2.0 Å. *Jornal of Molecular Biology*. 293: 595–611. 10.1006 / jmbi.1999.3179.



Dra. Marcela Ayala Aceves
Número de Cédula: 2484341



Dra. María Jesús Ferrara Guerrero
Número Económico: 22662