



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**Estudio bioquímico de la hidrolasa IAR3 de los
conjugados del ácido indol-3 acético**

Tesis que presenta

JOSUÉ SÁNCHEZ ALEGRÍA

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Bioquímica y Biología Molecular)

Mérida, Yucatán, México

2020

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de **Josué Sánchez Alegría** titulado: “**Estudio bioquímico de la hidrolasa IAR3 de los conjugados del ácido indol-3 acético**”, *¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.* fue realizado en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, en el laboratorio No. 24 del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., bajo la dirección del **Dr. Víctor Manuel Loyola Vargas**, dentro de la opción de Bioquímica y Biología Molecular, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente

Dra. Cecilia Hernández Zepeda
Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 23 de enero de 2020

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que en razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se regirán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Firma: _____

Josué Sánchez Alegría

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, y forma parte del proyecto titulado MODIFICACIÓN DEL GENOMA DE PLANTAS SUPERIORES USANDO CRISPR/CAS9 PARA ESTUDIAR LA DIFERENCIACIÓN CELULAR, número 1515, financiado por el CONACyT, bajo la dirección del Dr. Víctor Manuel Loyola Vargas. Josué Sánchez Alegría recibió una beca del CONACyT, No.

AGRADECIMIENTOS

Primero que nada agradezco a Dios porque me ha dado a mis padres, ninguna persona por muy amigo o hermano que sea, jamás podrían igualarlos a ellos, ellos son todo lo más valioso que tengo en mi vida, ellos jamás estarían conmigo en una fiesta, pero si estarían a mi lado en un proyecto, con ellos comparto mis éxitos y fracasos, a mis padres les debo todo hasta la vida, a ellos le agradezco mi autonomía de elegir mi propio camino y buscar mi propósito en esta vida, y no solamente me han dado esa libertad, si no que a pesar de ser totalmente independiente de ellos, ellos me han brindado todo su ayuda y me han librado de múltiples fracasos de cualquier índole y aquellos fracasos que he tenido se debe a mi terquedad de novato inexperto, ahora orgullosamente puedo decir que mis padres son el Sr. Josué Sánchez Sánchez y la Sra. Matilde Alegría Cruz padres exitosos del cual no tengo ninguna queja y que son un oasis hasta para los yernos, nueras, nietos y bisnietos, que a sus años van a cualquier parte que se les antoje ir.

Tengo mucho que agradecer al personal que se encuentra en el laboratorio 24 de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, en especial a la M.C. Rosa María Galaz Ávalos quien se convirtió en mi mejor amiga y a quien tengo en muy alta estima, le agradezco por los múltiples consejos y por qué en incontables ocasiones me ayudo en mi formación académica (por no decir todos los días) así como los múltiples favores que me brindó durante el tiempo que estuve en su laboratorio y por el apoyo incondicional que me otorgó en mi proyecto de tesis, también agradezco al Dr. Víctor M. Loyola Vargas por ser mi mentor, por dedicar su tiempo a revisar y poner en orden mi tesis, también eh de agradecer por los favores que me brindó durante mi estancia en su laboratorio, por supuesto que no podría olvidar esos consejos que suele dar en su seminario; sin lugar a duda jamás olvidaría a la M. C. Ligia Brito Argáez, una gran amiga que me ayudó en mi trabajo de tesis durante múltiples ocasiones y al Dr. Víctor Manuel Aguilar Hernández quien me brindó su apoyo incondicional en más de una vez, desde luego agradezco a mis compañeros del laboratorio por ser buenos compañeros.

ÍNDICE

LISTADO DE FIGURAS	IX
LISTADO DE CUADROS	XIX
ABREVIATURAS	XXI
RESUMEN.....	XXV
ABSTRACT	XXVI
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I	5
ANTECEDENTES	5
1. IMPORTANCIA ECONÓMICA DEL CAFETO.....	5
1.1. IMPORTANCIA DEL CAFETO EN MÉXICO	6
1.2. EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA	6
1.2.1. EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA INDIRECTA	7
1.2.2 EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DIRECTA	8
1.3. EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN CAFETO	8
1.4. LAS AUXINAS COMO REGULADORES DEL CRECIMIENTO VEGETAL	10
1.4.1. BIOSÍNTESIS.....	10
1.4.2. TRANSPORTE	12
1.4.3. MECANISMO DE ACTIVACIÓN, DESACTIVACIÓN Y DEGRADACIÓN DEL AIA	15

1.5. EFECTO DE LAS HIDROLASAS DURANTE LA ES EN <i>C. CANEPHORA</i>	17
1.5.1. SECUENCIACIÓN DE IAR3	18
1.6. PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA IAR3	20
1.6.1. PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE IAR3	20
1.6.2 SUSTRATOS DE LA AMIDOHIDROLASA IAR3	22
1.7. JUSTIFICACIÓN	24
1.8. OBJETIVO GENERAL	25
1.9. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
1.10. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN	25
1.11. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	25
CAPÍTULO II	31
PROCOLOS PARA LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNA RECOMBINANTE IAR3, SU PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA	31
2.1. INTRODUCCIÓN	31
2.2. MATERIALES Y MÉTODOS	32
2.2.1. LISIS ALCALINA DE <i>E. COLI</i> HST08	32
2.2.1.1 MATERIALES	32
2.2.1.1.2. MATERIAL BIOLÓGICO	32
2.2.1.1.3. INSTRUMENTACIÓN	32
2.2.1.1.4 REACTIVOS Y SOLUCIONES	33

2.2.1.1.5 METODOLOGÍA	33
2.2.1.1.6. NOTAS	35
2.2.2. PREPARACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES DE <i>E. COLI</i> ROSETTA 2 (DE3) Y TRANSFORMACIÓN CON EL PLÁSMIDO PETIAR3-3	37
2.2.2.1. MATERIALES	37
2.2.2.1.1. MATERIAL BIOLÓGICO	37
2.2.2.3 INSTRUMENTACIÓN	38
2.2.2.4 REACTIVOS	38
2.2.2.5 MÉTODOS	39
2.2.2.6 PREPARACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES <i>E. COLI</i> ROSETTA 2 (DE3)	39
2.2.2.7 TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES DE <i>E. COLI</i> ROSETTA 2 (DE3)	40
2.2.2.8 NOTAS	41
2.2.3.1 EXPRESIÓN DEL GEN RECOMBINANTE IAR3 DE <i>C. CANEPHORA</i> EN ROSETTA 2(DE3) Y LA PREPARACIÓN DEL LISADO BACTERIANO	42
2.2.3.2 MATERIALES	42
2.2.3.3 INSTRUMENTACIÓN	42
2.2.3.4 REACTIVOS Y AMORTIGUADORES	43
2.2.3.5 MÉTODOS	44
2.2.3.6 AISLAMIENTO DE CUERPOS DE INCLUSIÓN DE LA FRACCIÓN INSOLUBLE.	46
2.2.3.7 SOLUBILIZACIÓN DE PROTEÍNAS DE CUERPOS DE INCLUSIÓN	46

2.2.3.7.1 PRIMER PROTOCOLO PARA SOLUBILIZAR LOS CUERPOS DE INCLUSIÓN CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE SDS.....	46
2.2.3.7.2 SEGUNDO PROTOCOLO PARA SOLUBILIZAR LOS CUERPOS DE INCLUSIÓN CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE UREA.....	46
2.2.3.7.3 ACTIVACIÓN DE LA PROTEÍNA SOLUBLE.....	46
2.2.3.6 NOTAS.....	47
2.2.4.1 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA MEDIANTE EL MÉTODO DE PETERSON.....	48
2.2.4.2 MATERIALES.....	48
2.2.4.3 REACTIVOS.....	48
2.2.4.3 MÉTODOS.....	49
2.2.4.4 NOTAS.....	50
2.2.5.1 PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA IAR3, MEDIANTE CROMATOGRFÍA DE AFINIDAD CON METAL INMOVILIZADO (IMAC).....	50
2.2.5.2 INSTRUMENTACIÓN.....	50
2.2.5.3 REACTIVOS Y SOLUCIONES AMORTIGUADORAS.....	50
2.2.5.4 METODOLOGÍA.....	51
2.2.5.5 NOTAS.....	52
2.2.6.1 ANÁLISIS POR ELECTROFORESIS.....	53
2.2.6.1.1 INSTRUMENTACIÓN.....	53
2.2.6.1.2 REACTIVOS, SOLUCIONES AMORTIGUADORAS Y CONDICIONES DE LA CORRIDA.....	53

2.2.6.2 METODOLOGÍA	54
2.2.7.3 NOTAS	55
2.2.7.1 CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA CAPACIDAD CATALÍTICA DE LA PROTEÍNA IAR3	57
2.2.7.2 MATERIALES	57
2.2.7.3 INSTRUMENTACIÓN	57
2.2.7.4 REACTIVOS	57
2.2.7.5 MÉTODOS.....	58
2.2.7.6. ENSAYOS ENZIMÁTICOS	58
2.2.7.7 ANÁLISIS DEL AIA LIBERADO POR HPLC	58
2.3. RESULTADOS	58
2.3.1 LA PROTEÍNA IAR3 PRODUCIDA EN CEPAS DE <i>E. COLI</i> (ROSSETA 2DE3 Y ARCTIC 2DE3) SE ENCUENTRA EN CUERPOS DE INCLUSIÓN	58
2.3.2. PROTEÍNAS SOLUBILIZADAS CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE SDS Y UREA	62
2.3.3. PURIFICACIÓN DE LA IAR3 A PARTIR DE CUERPOS DE INCLUSIÓN	66
2.3.4. PURIFICACIÓN DE LA IAR3 SOLUBILIZADA CON 4 M DE UREA A PARTIR DE CUERPOS DE INCLUSIÓN	68
2.3.5. PURIFICACIÓN DE LA IAR3 SOLUBILIZADA CON 2% DE SDS A PARTIR DE CUERPOS DE INCLUSIÓN	74
2.3.6. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA IAR3	76
2.3.7. SEGUNDO ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS PROTEICAS PARA IDENTIFICAR LA ACTIVIDAD	

CATALÍTICA DE LA IAR3.....	83
2.4. DISCUSIÓN.....	88
2.4.2. PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA IAR3	89
2.4.3. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA PROTEÍNA IAR3.....	90
CAPÍTULO III	93
EL SISTEMA PARA LA PRODUCCIÓN DE LA IAR3 RECOMBINANTES ES IMPORTANTE SI SE QUIERE REALIZAR LA CINÉTICA DE DICHA PROTEÍNA.....	93
3. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	93
3.1. CONCLUSIONES	93
3.2. PERSPECTIVAS	94
BIBLIOGRAFÍA.....	95

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1 Sistema de embriogénesis directa en *C. canephora*. (A) Explantes de hojas evitando la nervadura central y los bordes. (B) Inducción de la embriogénesis somática directa. (C) Embriones somáticos obtenidos después de seis semanas de inducción. (D) Embrión cotiledonar. (E) Germinación del embrión, las flechas inferiores muestran el sistema radicular, las flechas superiores muestran el primer par de hojas. (F) Plantas de embriones somáticos después de cinco semanas (Quiroz-Figueroa et al., 2006a). 9

Figura 1.2. Rutas de metabolismo del AIA en las plantas superiores. A) La biosíntesis del IGP y del L-Trp, precursores del AIA, se lleva a cabo en los plástidos. La biosíntesis del L-Trp, el mayor precursor del AIA, se lleva a cabo por la vía del shikimato. B) Los siguientes pasos de la biosíntesis del AIA dependiente de L-Trp se llevan a cabo en el citoplasma. Se muestran cuatro rutas de biosíntesis de AIA dependientes de L-Trp en las plantas superiores: las rutas IAOx, IAM, IPyA y TRA. Las enzimas conocidas se muestran en azul. Los intermediarios que también actúan como precursores y productos de degradación de compuestos de defensa (tales como IGs y CAM) están en rojo. (C) Rutas para la degradación y conjugación del AIA. El AIA puede ser conjugado a aminoácidos y azúcares, o catabolizado para formar oxIAA. Algunos conjugados del AIA pueden ser vistos como una forma de almacenamiento que más tarde puede ser hidrolizada a la forma libre AIA. Las flechas sólidas muestran rutas en las cuales las enzimas, genes o intermediarios son conocidos. Las flechas cortadas indican vías que no están bien definidas. ANT, antranilato; CAM, camalexina; Glu, glucosa; IAAlD, indol-3-acetaldehído; IAET, indol-3-etanol; IAM, indol-3-acetamida; IAN, indol-3-acetonitrilo; IAOx, indol-3-acetaldoxima; IBA, ácido 3-indol butírico; IGP, indol-3-glicerol fosfato; IGs, indol glucosinolatos; IPyA, ácido 3-indol pirúvico; L-Trp, L-triptofano; NITs, nitrilasas; oxIAA, ácido 2-oxoindol-3-acético; TDCs, triptofano decarboxilasas; TRA, triptamina. Redibujado de Ljung (2013). 11

Figura 1.3 Proteínas que regulan el flujo de auxina intracelular y de célula-célula. Cuando se encuentra en forma desprotonada el AIA cruza la membrana plasmática (MP) a través de transportadores., Los transportadores PIN se localizan en la MP y en el

retículo endoplásmico (RE). Cuando el AIA se encuentra protonado, éste pasa la MP en forma pasiva. La localización coordinada de los diferentes transportadores determinan la dirección del flujo de auxina. Redibujado de Balzan et al. (Balzan et al., 2014). 13

Figura 1.4. Principales conjugados de AIA. A) conjugados de reserva de AIA mediados por las GH3 y las amidohidrolasas ILR1 e IAR3 como las principales enzimas encargadas de activar al AIA. B) ruta de degradación del AIA. Figura modificada de Couoh Dzul (2017). 15

Figura 1.5. Perfil de expresión del gen IAR3. Etapa de pre-acondicionamiento: -14 días antes de la inducción (dai), -7 dai, 0 dai. Etapa de la Inducción: 0.5 horas después de la inducción (hpi), 1 hpi, 1 día o días después de la inducción (dpi), 7 dpi, 14 dpi, 21 dpi. Flecha roja: fragmento amplificado de 390 pb. Flecha verde: testigo positivo del gen que codifica a la actina (250 pb). P: testigo positivo. N: testigo negativo (Avilez-Montalvo, 2015). 17

Figura 1.6. Perfil de expresión de ILR1 durante la embriogénesis somática en *C. canephora*. Etapa de pre acondicionamiento: -14 días antes de la inducción (dai), -7 dai, día 0 dai. Etapa de inducción: 0.5 horas después de la inducción (hpi), 1 hpi, 1 día o días posterior a la inducción (dpi), 7 dpi, 14 dpi, 21 dpi. dpi: días posteriores a la inducción. Flecha azul: fragmento del gen ILR1 amplificado a un tamaño de 780 pb. Flecha verde: testigo positivo del gen que codifica a la actina (250 pb). P: testigo positivo. N: testigo negativo (Avilez-Montalvo, 2015). 18

Figura 1.7. Secuencia de IAR3. Comparación de la secuencia de gen completo de *C. canephora* IAR3 de la muestra secuenciada, mediante el alineamiento con la secuencia IAR3 de la base de datos Sol Genomics Network (Avilez-Montalvo, 2015). 19

Figura 1.8. Mapa de restricción de IAR3Cc. En el mapa de IAR3 se muestran los sitios de restricción y se puede observar claramente la ausencia de BamHI y NdeI (Couoh Dzul, 2017). 20

Figura 1.9. Amplificación completa del gen IAR3 por PCR. Flecha roja indica la banda

del gen completo de IAR3, los testigos se muestran en los carriles tres y cuatro (Cough Dzul, 2017). 20

Figura 1.10. Vector de expresión PET15B. El vector pET-15b contiene múltiples sitios de clonación, entre todos ellos se encuentra los sitios que reconocen a las secuencias digeridas o cortadas con las enzimas de restricción BamHI y NdeI (Cough Dzul, 2017).. 21

Figura 1.11. Análisis para confirmar la obtención de IAR3. a) Gel SDS-PAGE. Carril 1: marcador molecular; carril 2: proteína pura de His-CclAR3-3; carril 3: proteína His.TIM (Triosa fosfato isomerás); carril 4: TIM sin la etiqueta de histidina. A partir de este gel se realizó el western blot **b)** Western blot. Carril 1: His-CclAR3-3 (positivo); carril 2: His-TIM (positivo); carril 3: TIM sin la etiqueta de histidinas (negativo) (Cough Dzul, 2017)..... 22

Figura 1.12. Secuencias conservadas en la cadena polipeptídicas de seis amidohidrolasas capaces de liberar los conjugados de AIA con aminoácidos. Las regiones sombreadas muestran las similitudes siendo lo contrario en las regiones no sombreadas (Davies et al., 1999). 24

Figura 2.1. Perfil proteico de *E. coli* (Rosetta 2 DE3) durante la producción de IAR3. MM (marcador molecular), TFI (testigo fracción insoluble), TSF (testigo fracción soluble), FI (3h) (fracción insoluble a las tres horas de cultivo) y su respectiva FS (fracción soluble), FI (6h) (fracción insoluble a las seis horas de cultivo), FI (12h) (fracción insoluble a las doce horas de cultivo). 60

Figura 2.2. Perfil proteico de *E.coli* (Artic DE3) durante la producción de IAR3. MM (marcador molecular), TFI (testigo fracción insoluble), TSF (testigo fracción soluble), FI(3h) (fracción insoluble a las tres horas de cultivo) y su respectiva FS (fracción soluble), FI(6h) (fracción insoluble a las seis horas de cultivo), FI(12h) (fracción insoluble a las doce horas de cultivo). 61

Figura 2.3. Proteínas de IAR3 recuperadas con diferentes concentraciones de SDS. MM: marcador molecular; 0.5%: de SDS en el amortiguador de 50 mM de Tris, 300 de NaCl; 1% de SDS utilizado; 1.5% porcentaje de SDS utilizado; 2% de SDS utilizado..... 64

Figura 2.4. Proteínas recuperadas con diferentes concentraciones de urea. MM: marcador molecular; TFI: Testigo (fracción soluble); FS: fracción soluble; 2M concentración de urea utilizada en el amortiguador para solubilizar los cuerpos de inclusión; 4 M concentración de urea; 8 M concentración de urea. 65

Figura 2.5. Purificación de la IAR3 a partir de la fracción insoluble. MM: marcador de masa molecular; EP: extracto procesado; L1: lavado 1 (5 mM de imidazol); L2: lavado 2 (20 mM de imidazol); L3: lavado 3 (40 mM de imidazol); E1: eluato 1 (500 mM de imidazol). 67

Figura 2.6. Purificación de la IAR3 mediante un gradiente de imidazol. MM: marcador de masa molecular; EP: extracto procesado; L1: lavado 1 (5 mM de imidazol); L2: lavado 2 (20 mM de imidazol); L3: lavado 3 (40 mM de imidazol); E1: eluato 1 (0.1 M de imidazol); E2: eluato 2 (0.15 M de imidazol); E3: eluato 3 (0.2 M de imidazol); E4: eluato 4 (0.25 M de imidazol), E5: eluato 5 (0.3 M de imidazol), E6: eluato 6 (0.35 M de imidazol); E8: eluato 8 (0.4 M de imidazol); E9: eluato 9 (0.45 M de imidazol), E10: eluato 10 (500 mM de imidazol); las masas moleculares marcadas en amarillo pertenecen al marcador molecular mientras el número en verde pertenece a la masa molecular de la proteína IAR3. 68

Figura 2.7. Verificación de la elusión de la IAR3 a 0.25 M de imidazol. MM: marcador de masa molecular; EP: extracto procesado; L1: lavado 1 (5 mM de imidazol); L2: lavado 2 (20 mM de imidazol); L3: lavado 3 (40 mM de imidazol); E1: eluato 1 (0.25 M de imidazol); E2: eluato 2 (0.45 M de imidazol); E3: eluato 3 (0.5 mM de imidazol); las masas moleculares marcados en amarillo pertenecen al marcador molecular mientras el número en verde pertenece a la masa molecular de la proteína IAR3. 70

Figura 2.8. Primeros resultados de la purificación de la proteína IAR3 usando Tritón, etanol, NaCl y β -mercaptoetanol en el lavado 1. MM: marcador de masa molecular; EC: extracto crudo, (1 mg de proteína total, 5 mM de imidazol, 0.01 M de β -mercaptoetanol y 0.5 de NaCl), EP: extracto procesado; L1: lavado 1 (5 mM de imidazol, 20% de etanol, 0.5 M de NaCl , 0.01 M de β -mercaptoetanol y 0.02 M de TRIS base PH 8); L2: lavado 2 (20

mM de imidazol); L3: lavado 3 (40 mM de imidazol); E1: eluato 1 (0.1 M de imidazol); E2: eluato 2 (0.25 M de imidazol) y los dos E3: eluato 3 (0.5 mM de imidazol); las masas moleculares marcados en negro pertenecen al marcador molecular mientras el número en verde pertenece a la masa molecular de la proteína IAR3..... 71

Figura 2.9. Resultados obtenidos al tratar el EC con NaCl y β -mercaptoetanol. MM: marcador de masa molecular; EC: extracto crudo, (10 mM de imidazol, 0.01 M de β -mercaptoetanol y 0.5 de NaCl), EP: extracto procesado; L1: lavado 1 (10 mM de imidazol, 20% de etanol, 0.5 M de NaCl , 0.01 M de β -mercaptoetanol y 0.02 M de TRIS base PH 8); L2: lavado 2 (20 mM de imidazol); L3: lavado 3 (40 mM de imidazol); E1: eluato 1 (0.1 M de imidazol); E2: eluato 2 (0.25 M de imidazol) y E3: eluato 3 (0.5 mM de imidazol); las masas moleculares marcados en negro pertenecen al marcador molecular mientras el número en verde pertenece a la masa molecular de la proteína IAR3. 73

Figura 2.10. Resultados obtenidos al tratar el EC para la purificación de la proteína IAR3 usando etanol, NaCl y β -mercaptoetanol. MM: marcador de masa molecular; EC: extracto crudo (5 mM de imidazol, 10 mM de β -mercaptoetanol, 20 mM de TRIS base pH 8 y 0.5 mM de NaCl), EP: extracto procesado; L1: lavado 1 (10 mM de imidazol, 20% de etanol, 0.5 M de NaCl , 0.01 M de β -mercaptoetanol y 0.02 M de TRIS base PH 8); L2: lavado 2 (20 mM de imidazol, 1% de tritón, 20% de etanol, 0.5 M de NaCl , 0.01 M de β -mercaptoetanol y 0.02 M de TRIS base PH 8); L3: lavado 3 (40 mM de imidazol, 1% de tritón, 20% de etanol, 0.5 M de NaCl , 0.01 M de β -mercaptoetanol y 0.02 M de TRIS base PH 8); E1: eluato 1 (0.1 M de imidazol); E2: eluato 2 (0.25 M de imidazol), E3: eluato 3 (0.5 mM de imidazol); las masas moleculares marcadas en negro pertenecen al marcador molecular mientras el número en verde pertenece a la masa molecular de la proteína IAR3. 74

Figura 2.11. Purificación de la proteína IAR3 a partir de las proteínas recuperadas con SDS. MM: marcador molecular, FT (flow through), L1: lavado 1 (40 mM de imidazol), L2: lavado 2 (80 mM de imidazol), L3: lavado 3 (100 mM de imidazol), E1: eluato 1 (250 mM de imidazol), E2: eluato 2 (500 mM de imidazol)..... 75

Figura 2.12. Primer análisis de la liberación del ácido indol-3 acético por cromatografía de capa fina. Testigo 1(T1): ácido indol-3 acético solubilizado en acetato de etilo; Testigo 2 (T2): conjugado de AIA con alanina (N-3-indolilacetil-L-alanina) solubilizado en acetato de etilo; Testigo 3 (T3): extracción realizada con acetato de etilo de la solución de reacción testigo que solo contenía el sustrato (100 μ L del volumen total de la reacción, 1 mM de N-(3-Indolilacetil-L-alanina, 100 mM Tris pH 8, 200 μ M MnCl₂ (cofactor), 1 mM C₄H₁₀O₂S₂ (DTT); Testigo 4 (T4): extracción realizada de la muestra testigo que contenía la proteína desnaturalizada (100 μ L del volumen total de la reacción, 10 μ g de proteína IAR3 desnaturalizada, 1mM de N-3-Indolilacetil-L-alanina, 100 mM Tris pH 7.5, 200 μ M MnCl₂, 1 mM DTT; prueba de la capacidad catalítica de la proteína IAR3 que fue recuperada de cuerpos de inclusión con 1% SDS (1%): (100 μ L del volumen total de la reacción, 10 μ g de proteína IAR3, 1 mM de N-(3-Indolilacetil-L-alanina, 100 mM Tris pH 8, 200 μ M MnCl₂ (cofactor), 1 mM C₄H₁₀O₂S₂ (DTT); prueba de la capacidad catalítica de la proteína IAR3 que fue recuperada de cuerpos de inclusión con 1.5% SDS (1.3%): (100 μ L del volumen total de la reacción, 10 μ g de proteína IAR3, 1 mM de N-3-Indolilacetil-L-alanina, 100 mM Tris pH 8, 200 μ M MnCl₂ (cofactor), 1 mM C₄H₁₀O₂S₂ (DTT); prueba de la capacidad catalítica de la proteína IAR3 que fue recuperada de cuerpos de inclusión con 2% SDS (2%): (100 μ L del volumen total de la reacción, 10 μ g de proteína IAR3, 1 mM de N-3-Indolilacetil)-L-alanina, 100 mM Tris pH 8, 200 μ M MnCl₂ (cofactor), 1 mM C₄H₁₀O₂S₂ (DTT). Prueba de la capacidad catalítica de la proteína IAR3 que fue recuperada de los cuerpos de inclusión con 3 M de urea (3M): (100 μ L del volumen total de la reacción, 10 μ g de proteína IAR3, 1 mM de N-3-Indolilacetil-L-alanina, 100 mM Tris pH 8, 200 μ M MnCl₂ (cofactor), 1 mM C₄H₁₀O₂S₂ (DTT); prueba de la capacidad catalítica de la proteína IAR3 que fue recuperada de cuerpos de inclusión con 4 M de urea (4M): (100 μ L del volumen total de la reacción, 10 μ g de proteína IAR3, 1 mM de N-3-Indolilacetil-L-alanina, 100 mM Tris pH 8, 200 μ M MnCl₂ (cofactor), 1 mM C₄H₁₀O₂S₂ (DTT); las muestras mencionadas previamente fueron incubadas en oscuridad durante 12 horas a 25 °C, a excepción de las muestras testigos 1 y 2, ya que éstas simplemente son colocadas en el TLC para tener una referencia de donde se puede encontrar en la placa el producto (AIA) y el sustrato (N-3-Indolilacetil-L-alanina)..... 77

Figura 2.13. Segundo análisis de la liberación del ácido indol-3 acético por cromatografía de capa fina (TLC). Testigo 1(T1): ácido indol-3 acético solubilizado en acetato de etilo; testigo 2 (T2): conjugado de AIA con alanina (N-3-indolilacetil-L-alanina) solubilizado en acetato de etilo; testigo 3 (T3): extracción realizada con acetato de etilo de la solución de reacción testigo que no tenía el sustrato ni la proteína IAR3 (100 μ L del volumen total de la reacción, 100 mM Tris pH 7.5, 200 μ M MnCl₂ (cofactor), 1 mM C₄H₁₀O₂S₂ (DTT)); testigo 4 (T4): extracción realizada de la muestra testigo que contenía el sustrato pero no la proteína IAR3(100 μ L del volumen total de la reacción, 1mM de N-3-Indolilacetil-L-alanina, 100 mM Tris pH 7.5, 200 μ M MnCl₂, 1 mM C₄H₁₀O₂S₂ (DTT); testigo 5 (T5): extracción realizada de la muestra testigo que contenía la proteína IAR3 desnaturalizada y el sustrato (100 μ L del volumen total de la reacción, 10 μ g de proteína IAR3 desnaturalizada, 1 mM de N-3-indolilacetil-L-alanina, 100 mM Tris pH 7.5, 200 μ M MnCl₂, 1 mM C₄H₁₀O₂S₂ (DTT); muestra 1 (M1): prueba de la capacidad catalítica de la proteína IAR3 que fue recuperada de cuerpos de inclusión con 1% SDS (100 μ L del volumen total de la reacción, 10 μ g de proteína IAR3, 1 mM de N-3-indolilacetil-L-alanina, 100 mM Tris pH 7.5, 200 μ M MnCl₂ (cofactor), 1 mM C₄H₁₀O₂S₂ (DTT); muestra 2 (M2): prueba de la capacidad catalítica de la proteína IAR3 que fue recuperada de cuerpos de inclusión con 1.5% SDS (100 μ L del volumen total de la reacción, 10 μ g de proteína IAR3, 1 mM de N-3-Indolilacetil-L-alanina, 100 mM Tris pH 7.5, 200 μ M MnCl₂ (cofactor), 1 mM C₄H₁₀O₂S₂ (DTT); muestra 3 (M3): prueba de la capacidad catalítica de la proteína IAR3 que fue recuperada de cuerpos de inclusión con 2% SDS (100 μ L del volumen total de la reacción, 10 μ g de proteína IAR3, 1 mM de N-3-indolilacetil-L-alanina, 100 mM Tris pH 7.5, 200 μ M MnCl₂ (cofactor), 1 mM C₄H₁₀O₂S₂ (DTT); muestra 4 (M4): prueba de la capacidad catalítica de la proteína IAR3 que fue recuperada de cuerpos de inclusión con 3 M de urea (100 μ L del volumen total de la reacción, 10 μ g de proteína IAR3, 1 mM de N-3-indolilacetil-L-alanina, 100 mM Tris pH 7.5, 200 μ M MnCl₂ (cofactor), 1 mM C₄H₁₀O₂S₂ (DTT); muestra 5 (M5): prueba de la capacidad catalítica de la proteína IAR3 que fue recuperada de cuerpos de inclusión con 4 M de urea (100 μ L del volumen total de la reacción, 10 μ g de proteína IAR3, 1 mM de N-3-indolilacetil-L-alanina, 100 mM Tris pH 7.5, 200 μ M MnCl₂ (cofactor), 1 mM C₄H₁₀O₂S₂ (DTT); las muestras mencionadas previamente fueron incubadas en oscuridad durante 2 horas a 37 °C, a excepción de las

muestras testigos 1 y 2, ya que estas simplemente son colocadas en el TLC como referencia del producto (AIA) y el sustrato (N-3-Indolilacetil-L-alanina) en la placa de TLC.

..... 79

Figura 2.14. Tercer análisis catalítico de la enzima IAR3 que fue recuperada de los cuerpos de inclusión con 1% de SDS mediante la visualización de la liberación ácido indol-3 acético por TLC; prueba de diferentes concentraciones de proteínas IAR3. Testigo 1(T1): ácido indol-3 acético solubilizado en acetato de etilo; testigo 2 (T2): conjugado de AIA con alanina (N-indolilacetil-L-alanina) solubilizado en acetato de etilo; testigo 3 (T3): extracción realizada con acetato de etilo de la solución de reacción testigo que no tenía el sustrato ni la proteína IAR3 (100 μ L del volumen total de la reacción, 100 mM Tris pH 7.5, 200 μ M MnCl₂ (cofactor), 1 mM C₄H₁₀O₂S₂ (DTT)); testigo 4 (T4): extracción realizada de la muestra testigo que contenía el sustrato pero no la proteína IAR3 (100 μ L del volumen total de la reacción, 1mM de N-3-Indolilacetil-L-alanina, 100 mM Tris pH 7.5, 200 μ M MnCl₂, 1 mM C₄H₁₀O₂S₂ (DTT)); testigo 5 (T5): extracción realizada de la muestra testigo que contenía la proteína IAR3 desnaturalizada con el sustrato (100 μ L del volumen total de la reacción, 10 μ g de proteína IAR3 desnaturalizada, 1mM de N-3-Indolilacetil-L-alanina, 100 mM Tris pH 7.5, 200 μ M MnCl₂, 1 mM C₄H₁₀O₂S₂ (DTT)); muestra 1 y 2 (M1 y M2) prueba catalítica de 1 μ g de proteína IAR3: (100 μ L del volumen total de la reacción, 1 μ g de proteína IAR3, 1 mM de N-3-Indolilacetil-L-alanina, 100 mM Tris pH 7.5, 200 μ M MnCl₂ (cofactor), 1 mM C₄H₁₀O₂S₂ (DTT)); Muestra 3 Y 4 (M3 y M4): prueba catalítica de 10 μ g de proteína IAR3 (100 μ L del volumen total de la reacción, 10 μ g de proteína IAR3, 1 mM de N-3-Indolilacetil-L-alanina, 100 mM Tris pH 7.5, 200 μ M MnCl₂ (cofactor), 1 mM C₄H₁₀O₂S₂ (DTT)); muestra 5 y 6 (M5 y M6): prueba catalítica de 20 μ g de proteína IAR3 (100 μ L del volumen total de la reacción, 20 μ g de proteína IAR3, 1 mM de N-3-Indolilacetil-L-alanina, 100 mM Tris pH 7.5, 200 μ M MnCl₂ (cofactor), 1 mM C₄H₁₀O₂S₂ (DTT)). Las muestras mencionadas previamente fueron incubadas en oscuridad durante 2 horas a 37 °C, a excepción de las muestras testigos 1 y 2, ya que estas simplemente son colocadas en el TLC como referencia del producto (AIA) y el sustrato (N-3-Indolilacetil-L-alanina) en la placa de TLC. 81

Figura 2.15. Cromatograma de la muestra testigo de la capacidad catalítica de IAR3.

Volumen de inyección de muestras: 50 μ L, picos 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8 y 9: compuestos no identificados, pico 4: N-3-Indolilacetil-L-alanina. El pico del AIA debería de haber salido al minuto 5.06, por lo que debería de estar entre los picos 5 y 6. 82

Figura 2.16. Cromatograma de la muestra testigo de la capacidad catalítica de IAR3.

Volumen de inyección de muestras: 50 μ L, picos 1, 2, 3, 4, 6, 7 y 8: compuestos no identificados, pico 5: N-3-Indolilacetil-L-alanina. El pico del AIA debió de haber salido al minuto 5.06, por lo que debería de estar entre los picos 5 y 6. 83

Figura 2.17. Análisis de los productos obtenidos de la reacción enzimática de IAR3 por TLC.

AIA: ácido indol-3 acético, T: testigo (proteína IAR3 desnaturalizada con calor), F.S: fracción soluble (proteínas producidas por *E. coli* durante la producción de la proteína recombinante de IAR3), E.C: extracto de *E. coli* (lisado bacteriano obtenido del cultivo de *E. coli* (Rosetta 2 DE3) sin el plásmido que contiene el gen recombinante de IAR3), IAR3: carril que muestra el producto de la reacción de la proteína recombinante de IAR3; XX: ausencia de manchas, #: Números de manchas. El primer carril pertenece al AIA solubilizado en acetato de etilo, debido a la concentración del AIA que se corrió en la placa, la mancha de dicho carril supera el RF de 0.85 que normalmente pertenece al AIA, los resultados del HPLC Fig. 2.18, confirman dicho resultado, ya que se aisló la muestra a la altura de un RF de 0.85; el segundo carril marcado con la letra "C" pertenece al conjugado del AIA solubilizado con acetato de etilo, la mancha del conjugado se encuentra a un RF 0.475. 85

Figura 2.18. AIA libre en la muestra testigo de IAR3 desnaturalizada.

Resultado del análisis por HPLC de la mancha representada con un signo de interrogación en la Fig. 2.17; los primeros tres picos son compuestos no identificados, mientras que el último pico al minuto 5.155 representa probablemente al AIA libre. 86

Figura 2.19. Cromatograma de la fracción soluble.

Los primeros cuatro picos formados en pertenecen a compuestos no identificados, mientras que el ultimo pico formado al minuto 5.180 podría ser AIA libre. 86

Figura 2.20. Cromatograma del extracto de *E. coli*.

Ausencia del AIA libre o conjugado.

..... 87

Figura 2.21. Cromatografía de las manchas 14 y 15, aisladas de la cromatografía de TLC, pertenecientes al producto obtenido del análisis catalítico de la proteína IAR3. Ausencia del AIA libre o conjugado..... 87

LISTADO DE CUADROS

No se encuentran elementos de tabla de ilustraciones.

ABREVIATURAS

AIA	Ácido indol-3 acético
AIA-Ala	Ácido indol-3 acético-alanina
AIA-aminoácidos	Ácido indol-3 acético-aminoácidos
AIA-Asp	Ácido indol-3 acético-aspártico
AIA-Glu	Ácido indol-3 acético-glutámico
AIA-Gly	Ácido indol-3 acético-glicina
AIA-Leu	Ácido indol-3 acético-leucina
AIA-Phe	Ácido indol-3 acético-fenilalanina
AIA-Val	Ácido indol-3 acético-valina
AIB	Ácido indol-3 butírico
ANA	Ácido naftalén-1-acético
ATC	Ácido tricloroacético
BA	Benciladenina
CTC	Cobre tartrato carbonato
DSO	Desoxicolato de sodio
DTT	Dithiotreitol
EC	Embriogénesis cigótica
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ES	Embriogénesis somática
ESD	Embriogénesis somática directa
ESI	Embriogénesis somática indirecta
GH3	Gretchen Hagen-3

IAOx:	indol-3-acetaldoxima
IAR3	Indol-3 acetic acid alanine resistant
ILL1	Indol-3 acetic acid leucine resistant like-1
ILL2	Indol-3 acetic acid leucine resistant like-2
ILL3	Indol-3 acetic acid leucine resistant like-3
ILL5	Indol-3 acetic acid leucine resistant like-5
ILR1	Indol-3 acetic acid leucine resistant 1
IMAC	Cromatografía de afinidad a iones metálicos
IPA	Ácido indol-3-pirúvico
IPTG	Isopropil β -d-1-tiogalactopiranosido
KIN	Cinetina
LB	Luria Bertani Broth
MP	Membrana plasmática
MS	Murashige and Skoog
Ndel	Endonucleasa aislada de <i>Neisseria denitrificans</i>
PA	Persulfato de amonio
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RCV	Reguladores del crecimiento vegetal
RE	Retículo endoplásmico
SDS	Dodecilsulfato de sodio
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletano 1,2-diamina
TLC	Cromatografía en capa fina

RESUMEN

La amidohidrolasa IAR3 es una de las seis enzimas pertenecientes a la familia de las peptidasas M20D que se expresan durante la embriogénesis somática de *C. Canephora*. La función de estas amidohidrolasas es liberar al ácido indol-3-acético conjugado con aminoácidos y carbohidratos. Al igual que el resto de los miembros de esta familia de amidohidrolasas, la IAR3 es una proteína capaz de reconocer más de un sustrato, sin embargo, suele tener mayor predilección por el conjugado de AIA-alanina, si bien esto puede variar dependiendo de la especie de vegetal. Tanto los ensayos bioquímicos como la cristalografía han demostrado dichas características y sobre todo explican por qué ocurre dicho fenómeno, dichos estudios se llevaron a cabo aislando el gen que codifica para la IAR3 y expresándolo en forma heteróloga en hospederos procariontes (principalmente diferentes cepas de *Escherichia coli*). Los resultados obtenidos con la proteína pura mostraron que la afinidad de la IAR3 es mayor a los conjugados de AIA-Ala, AIA-Lys y AIA-Leu, en dicho orden, aunque es necesario mencionar que dichos resultados pueden cambiar, cuando se cambia el modelo de estudio. Los estudios cristalográficos mostraron que los cambios de posición de los aminoácidos que conforman el sitio catalítico determinan la afinidad de dicha molécula por su sustrato, es decir, que la interacción proteína-cofactor y proteína-sustrato se ve alterado significativamente tan solo si un aminoácido cambia de posición o si es sustituido por otro aminoácido. Tomando como referencia dichos estudios se procedió a realizar la caracterización bioquímica de la amidohidrolasa IAR3 de *C. canephora* con la finalidad de determinar la afinidad por los conjugados de AIA-aminoácidos, dicho resultados serán parte de la información que se necesita obtener para entender cuáles son los cambios bioquímicos que permiten a una célula somática convertirse en un embrión somático.

ABSTRACT

The amidohydrolase IAR3 is one of six enzymes belonging to the family of M20D peptidases that are expressed during the somatic embryogenesis of *C. canephora*. The function of these amidohydrolases is to release indole-3-acetic acid conjugated with amino acids and carbohydrates. Like the rest of the members of this family of amidohydrolases, IAR3 is a protein capable of having more than one substrate; however, it tends to have a greater predilection for the AIA-alanine conjugate, although this may vary depending on the plant species. Both biochemical assays and crystallography have demonstrated these characteristics and above all explain why this phenomenon occurs. These studies were carried out by isolating the gene coding for IAR3 and expressing it heterologously in prokaryotic hosts (mainly different strains of *Escherichia coli*). The results obtained with the pure protein showed that the affinity of the IAR3 is higher than the conjugates of AIA-Ala, AIA-Lys, and AIA-Leu, in that order, although it is necessary to mention that these results can change when the study model. The crystallographic studies showed that the position changes of the amino acids that make up the catalytic site determine the affinity of the said molecule for its substrate, that is, that the protein-cofactor and protein-substrate interaction is significantly altered only if an amino acid change of position or if it is replaced by another amino acid. Taking as reference those studies, the biochemical characterization of the amidohydrolase IAR3 of *C. canephora* was carried out with the purpose of determining the affinity for the conjugates of AIA-amino acids, these results will be part of the information that needs to be obtained to understand which are the biochemical changes that allow a somatic cell to become a somatic embryo.

INTRODUCCIÓN

Las auxinas endógenas son un grupo de moléculas que pertenecen a la familia de los reguladores del crecimiento vegetal (RCV) que intervienen durante todo el desarrollo de la planta (LeClere et al., 2002) por lo que su homeostasis está estrictamente regulada. Este proceso es fundamental para el desarrollo y la supervivencia de las plantas (Ludwig-Müller, 2011; Campanella et al., 2011), por lo que cualquier alteración en las concentraciones de estas moléculas desencadenan una serie de reacciones bioquímicas como respuesta inmediata. Los cambios en la concentración del ácido-3-indol acético (AIA) en la planta pueden ser influenciados por diversos factores ambientales ya sean bióticos o abióticos, o por el estadio de desarrollo de la planta. Las reacciones bioquímicas que se desencadenan en las células vegetales, como resultado de la alteración en la concentración del AIA provocado por un factor biótico, da a la planta una ventaja que le ayuda a contrarrestar la invasión de patógenos o responder mediante reacciones bioquímicas al llamado de una simbiosis. Por otro lado, frente a factores abióticos como fotoperiodo, temperatura, salinidad de los suelos, falta de nutrientes o estrés hídrico, las plantas son capaces de sobrevivir y adaptarse. Así mismo durante las diversas etapas del desarrollo vegetal, los cambios en la concentración del AIA están ligados a la geminación, al desarrollo del sistema radicular, a la formación de tallos, a la de formación de yemas, de hojas, de nuevos tallos aéreos, de la floración, de la producción de frutos y a los dos tipos de embriogénesis, cigótica o somática.

Se podría pensar que debido a la importancia del AIA, la cantidad libre de este RCV podría encontrarse en concentraciones elevadas, sin embargo, se ha comprobado que las concentraciones del AIA libre o activo en plantas no superan el 10% del total de AIA determinado, ya que más del 90% se encuentra en forma conjugada con carbohidratos o aminoácidos. La conjugación de las auxinas es una parte muy importante en la homeostasis del AIA (Rampey et al., 2004; LeClere et al., 2002), ya que define el destino de esta molécula. La conjugación del AIA se lleva a cabo cuando la parte funcional del carboxilo del AIA se une con el grupo amino del aminoácido formando un enlace amido. La formación de este enlace la llevan a cabo los productos de nueve genes que son miembros de la familia de las GH3 (Ruiz Rosquete et al., 2012). Por otra parte, el AIA es

liberado de su conjugado por un grupo de enzimas llamadas amidohidrolasas de la familia de las peptidasas M20D. El destino de la auxina depende del tipo de aminoácido con el que esté conjugado; por ejemplo, los conjugados de auxina con los ácidos aspártico (AIA-Asp) y glutámico (AIA-Glu) están destinados a ser degradados, mientras que la hidrólisis de los conjugados del AIA con la leucina (de AIA-Leu) y la alanina (AIA-Ala) liberan al AIA, lo que le permite a la planta recuperar una parte de las moléculas de AIA que se encontraban almacenadas e “inactivas” (Rampey et al., 2004; LeClere et al., 2002).

En esta investigación se realizó un análisis del perfil de expresión de cinco genes miembros de la familia de las amidohidrolasas durante la embriogénesis somática (ES) en *Coffea canephora*. Estos genes fueron detectados a partir del análisis de transcritos mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), dichos miembros son los genes ILR1, ILL2, IAR3, ILL6 e ILL3. Se sabe, por estudios previos, que las proteínas codificadas por estos genes son capaces de liberar al AIA conjugado con aminoácidos, ya sea para su degradación o activación. El estudio cinético de amidohidrolasas aisladas de *Arabidopsis thaliana*, y *Medicago truncatula*, entre otras plantas, mostraron que el grado de afinidad de las enzimas IAR3, ILL2 e ILR1, por sus respectivos sustratos cambian dependiendo de la especie vegetal, es decir, que el homólogo de la IAR3 en *C. canephora* puede que no tenga la misma afinidad e inclusive no reconozca al sustrato preferido de la IAR3 de *A. thaliana*, (Rampey et al., 2004; LeClere et al., 2002). Partiendo de esta premisa, uno de los estudios realizados para comprender los procesos bioquímicos de la ES de *C. canephora*, comenzó con el aislamiento del gen IAR3 de *C. canephora* el cual se clonó al vector PET15b para luego expresar dicho gen en la bacteria de *Escherichia coli* (Rossetta 2 DE3), esto permitió la purificación de la proteína IAR3 mediante cromatografía de afinidad a iones metálicos (IMAC). A partir de la enzima pura se abre la oportunidad de analizar las propiedades cinéticas de la enzima IAR3 de *C. canephora*, así como la cristalización de dicha proteína.

El proceso descrito de manera general para estudiar a la enzima IAR3, no es nuevo, ya que LeClere et al. (2002) realizaron un procedimiento similar para el análisis de las enzimas ILR1, IAR3, ILL1 e ILL2 de *A. thaliana*, ellos reportan que la enzima ILR1 tienen una preferencia mayor por los conjugados del AIA con fenilalanina (AIA-Phe) y AIA-Leu,

mientras la enzima IAR3 tuvo más preferencia por el conjugado AIA-Ala, si bien es importante mencionar que también fue capaz de hidrolizar una serie de otros conjugados en condiciones favorables para dicho proceso.

Por otra parte, el aporte de este trabajo fue el identificar los sustratos de IAR3 en *C. canephora* durante la ES, los datos obtenidos nos dan una visión más clara de los procesos bioquímicos y moleculares que están ocurriendo durante la diferenciación celular uno de los procesos más importantes y menos estudiados de la ES.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1. IMPORTANCIA ECONÓMICA DEL CAFETO

El cafeto es uno de los cultivos más importantes en el mundo. México es el quinto productor mundial de café. El cafeto es cultivado en más de 80 países, en alrededor de 11 millones de hectáreas en África, Asia y América; con ventas estimadas en 173,000 millones de dólares y la intervención de aproximadamente 100 millones de personas durante su cultivo y manejo. La mayor parte de la producción mundial se localiza en zonas rurales pequeñas, lo cual representa una fuente de ingresos y negocio familiar de millones de personas (ICO, 2019; Martins et al., 2017).

El género *Coffea* está compuesto por más de 127 especies. Las plantas de cafeto son árboles leñosos perennes que difieren en su tamaño, morfología y condiciones de adaptación. *Coffea arabica* y *C. canephora*, conforman el 61 y 39% de la producción mundial, respectivamente (ICO, 2019).

C. canephora ($2n = 2x = 22$ cromosomas) es una especie diploide, de polinización cruzada (alógama) y por lo tanto altamente heterocigótica, consiste de poblaciones polimórficas de individuos heterocigotos; es más resistente a los patógenos y a diferentes tipos de extremos ambientales, produce un café de menor calidad y contiene una mayor cantidad de cafeína. Es uno de los dos padres de *C. arabica* (Lashermes et al., 1999).

C. arabica ($2n = 4x = 44$ cromosomas), proviene de una hibridación espontánea, natural, entre *C. canephora* y *C. eugenioides* (Lashermes et al., 1999). Es una especie alotetraploide, autógama, proporciona un café de mayor calidad, con un menor contenido de cafeína, sin embargo, es más susceptible a los patógenos.

El café es una planta que crece en algunas regiones comprendidas entre los trópicos de Capricornio y de Cáncer. Puede ser cultivada desde el nivel del mar hasta 2,000 metros sobre el nivel del mar (msnm). Se desarrolla en zonas con temperaturas que varían desde los 22 a los 30 °C, altitud promedio de 800 msnm y bajo regímenes de precipitación de

1,200 a 2,000 mm anuales; sin embargo, requieren de un periodo corto de sequía para estimular la floración (Denoeud et al., 2014; DaMatta y Ramalho, 2006). En particular, *C. arabica* requiere altitudes entre 1,200 y 1,800 msnm para producir café de la mejor calidad (Vinod et al., 2006; Knox y Huffaker, 1996).

1.1. IMPORTANCIA DEL CAFETO EN MÉXICO

En México, el cafeto representa el 4.3 % del PIB en la industria alimentaria y el 7.1 % PIB en el sector agrícola; los cultivos de cafeto están establecidos en los estados de Veracruz, Puebla, Colima, Hidalgo, Nayarit, Oaxaca, Jalisco, Guerrero, San Luis Potosí, Querétaro, Tabasco y Chiapas, este último estado ocupa el primer lugar con 40% de la producción total del país. Por otra parte, el cafeto cultivado en México es de la más alta calidad debido a las condiciones en las que se le cultiva.

1.2. EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

Las células somáticas vegetales cuentan con la información genética necesaria para regenerar una planta completamente funcional, por lo que en presencia de diversos factores, tales como los RCV se activan o apagan diversos genes, provocando una serie de cambios bioquímicos, moleculares y morfológicos que dan lugar a la formación de un embrión somático, a dicho proceso se le conoce como ES (Loyola-Vargas y Ochoa-Alejo, 2016; Quiroz-Figueroa et al., 2006a).

La capacidad de una célula, para generar un organismo completo es una característica propia de las plantas (Debergh y Zimmerman, 1993); sin embargo, se desconoce gran parte de los aspectos bioquímicos y moleculares que se llevan a cabo durante dicho proceso (Loyola-Vargas y Ochoa-Alejo, 2016). Por otro lado, existen diferencias y similitudes entre la ES y la embriogénesis cigótica (EC). La ES tiene la ventaja de que se puede manipular para el estudio del proceso, ya que al realizarse en condiciones controladas y manipulables permite la experimentación y la observación, es decir, permite acciones experimentales en las cuales se cuestiona al sistema sobre los acontecimientos bioquímicos, moleculares y morfológicas de las diversas etapas por las que atraviesan las células somáticas para diferenciarse y convertirse en embriones somáticos, así como la obtención de respuestas en tiempos relativamente cortos; esta característica se convirtió

en el foco de atención tanto en la ciencia como en la industria biotecnológica, ya que ha sido utilizada mayormente en el mejoramiento genético de vegetales de interés económico (Canché-Moor et al., 2006; Quiroz-Figueroa et al., 2006b). En tanto que la EC es mucho más difícil de estudiar, dado lo pequeño del embrión cigótico, lo complejo que es el receptáculo en el cual se desarrolla y sobre todo a que no se pueden manipular las condiciones experimentales. La ES puede ser indirecta (ESI) directa (ESD) (George, 2008).

1.2.1. Embriogénesis somática indirecta

La ESI tiene muchas similitudes con la embriogénesis cigótica (EC). En la ESI, previo a la formación del embrión, el sistema atraviesa por una fase de formación de una masa desorganizada de células (conocida como callo) (Fehér et al., 2016), parcialmente diferenciadas (Fehér, 2019; Sugimoto et al., 2011), lo que sugiere que la dediferenciación no es un requisito absoluto para la regeneración de embriones. Esta fase es crucial, ya que es cuando se define el destino celular mediado por la concentración de los RCV. Por otra parte, se ha demostrado que los callos formados a altas concentraciones de auxina generan embriones somáticos provenientes de un conjunto de células reorganizadas cuando se elimina la auxina exógena, las preguntas generadas a partir de dicho acontecimiento hallaron respuestas en los estudios realizados por Bai et al. (2013) en los que se demostró que en ausencia de la auxina exógena, la expresión de los genes *YUCCA* (*YUC*) inducen la síntesis de la auxina endógena, mientras que la acumulación local de dichas moléculas producen la expresión del gen *PINFORMED1* (*PIN1*), lo que activa la expresión del gen *WUSCHEL* (*WUS*) encargado de regular la identidad del meristemo apical (Su et al., 2009). Otro gen que se expresa en paralelo al gen *WUS* es el gen *WOUS-RELATED HOMEBOX 5* (*WOX5*) encargado de la organización del meristemo radical, la expresión de este gen correlaciona con las regiones ricas en citocininas y con la formación del meristemo de la raíz (Tian et al., 2014).

La ESI atraviesa por una reorganización total de la síntesis de los RCV, así como la distribución y expresión génica en los diferentes grupos de células presentes en los callos (Fehér et al., 2016).

1.2.2 Embriogénesis somática directa

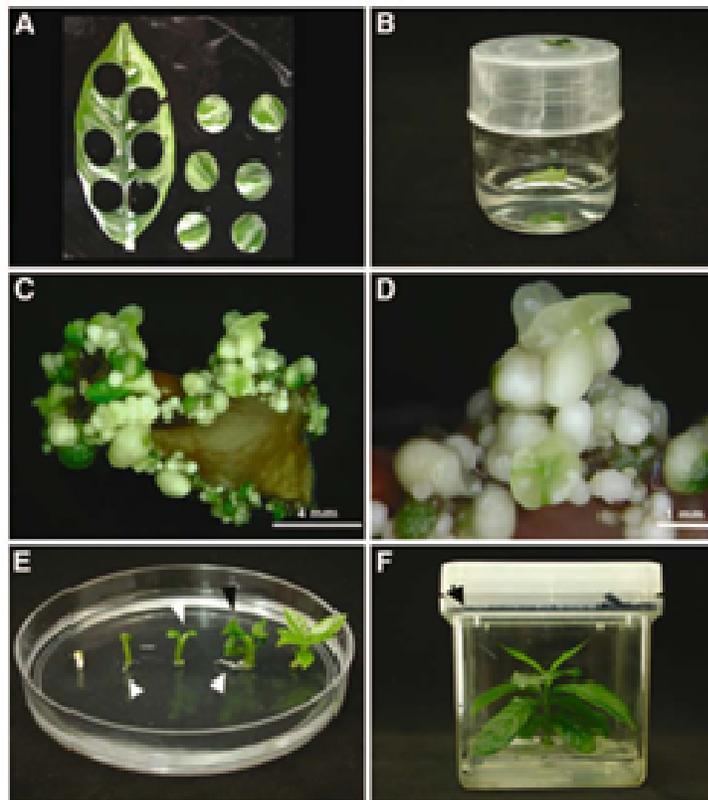
La ESD se caracteriza por mostrar una proliferación mínima de tejido desorganizado antes de la formación de los embriones somáticos, Diversos estudios sugieren que las células al contar con la maquinaria genética para producir un nuevo individuo, las convierte en células competentes pro-embriogénicas y que solo necesita las condiciones y estímulos adecuados en las que intervienen los reguladores de crecimiento como las auxinas, y citocininas, entre otros para generar embriones a partir de células somáticas sin pasar por la fase de formación de callos, como es el caso de la ESI (Duarte-Aké y De-la-Peña, 2016; Elhiti y Stasolla, 2016; Fehér et al., 2016; Loyola-Vargas y Ochoa-Alejo, 2016; Nic-Can y Loyola-Vargas, 2016; Nic-Can et al., 2016).

1.3. Embriogénesis somática en café

Los estudios sobre la ES en diferentes especies del género *Coffea* inició a principio de la década de los 70' del siglo pasado cuando el grupo de Staritsky indujo la ES de *C. canephora* a partir de callos de internudos (Staritsky, 1970). Posteriormente se lograron desarrollar protocolos experimentales de ES en *C. arabica* a partir de explantes de hojas (Söndahl et al., 1979; Söndahl y Sharp, 1977; Herman y Haas, 1975), después se diseñaron sistemas con el uso de citocininas como la bencil adenina (BA) y la cinetina (KIN) (Yasuda et al., 1985; Dublin, 1981), sin embargo, el prolongado tiempo de inducción, así como los problemas de contaminación estaban presentes en estos sistemas (Loyola-Vargas et al., 2016).

En nuestro laboratorio hemos creado un sistema embriogénico eficiente de *C. canephora*, logrando acortar los tiempos de inducción a cinco semanas así como aumentar el número de embriones por explantes a aproximadamente 250, este protocolo consta de dos fases, una llamada pre-condicionamiento en el que las plantas se cultivan en un medio con ANA y KIN durante 14 días, seguida de la etapa de inducción en la que se transfieren explantes foliares a un medio libre de auxina (Quiroz-Figueroa et al., 2006a) (Fig. 1.1). En los últimos años nos hemos enfocado en estudiar, los diversos factores que podrían estar modulando la señal que dispara que una o varias células somáticas se transformen en un embrión, entre ellos el efecto de los RCV. Hasta el momento los últimos estudios de

cuantificación de auxinas endógenas, así como de sus conjugados, han revelado que la presencia de ANA y KIN, provocan un aumento importante en la auxina libre endógena así como de algunos de sus conjugados (Ayil-Gutiérrez et al., 2013). Cuando los explantes son cultivados en el medio de inducción con BA, el AIA disminuye al igual que sus conjugados, evidenciando el dinamismo de su homeostasis, en la que posiblemente estén involucrados tanto su biosíntesis, conjugación, catabolismo como su transporte (Ayil-Gutiérrez et al., 2013). Debido a que durante la etapa de inducción no se requiere la presencia de auxina exógena, es un buen modelo para estudiar la dinámica de la auxina endógena y conocer la forma en que se modula el programa genético de las células que



dan origen al embrión somático.

Figura 1.1 Sistema de embriogénesis directa en *C. canephora*. (A) Explantes de hojas evitando la nervadura central y los bordes. (B) Inducción de la embriogénesis somática directa. (C) Embriones somáticos obtenidos después de seis semanas de inducción. (D) Embrión cotiledonar. (E) Germinación del embrión, las flechas inferiores muestran el sistema radicular, las flechas superiores muestran el primer par de hojas. (F) Plantas de embriones somáticos

después de cinco semanas (Quiroz-Figueroa et al., 2006a).

Aunque en un principio esta especie fue estudiada por su importancia económica, actualmente funciona como un modelo experimental para conocer los mecanismos bioquímicos involucrados en la transformación de una célula somática en un embrión somático. En estudios realizados anteriormente se ha comprobado que las auxinas juegan un papel muy importante en la inducción de la ES, ya que su biosíntesis *de novo*, su conjugación y transporte son cruciales para la inducción de embriones somáticos en *C. canephora* (Márquez-López et al., 2018; Ayil-Gutiérrez et al., 2013).

1.4. LAS AUXINAS COMO REGULADORES DEL CRECIMIENTO VEGETAL

Similar a una orquesta, los RCV son los que fungen como directores del desarrollo de la planta mediante cambios en sus concentraciones, la auxina es quien inicia el proceso dirigiendo la primera pieza del desarrollo y es inhibida por las citocininas para dar paso a la siguiente etapa del proceso en la ES; sin embargo, la participación de las auxinas no se limita al inicio del proceso de la ES, fuera del cultivo *in vitro* las auxinas se encuentran presentes en diferentes procesos fisiológicos de la planta, los que van desde el desarrollo del eje embrionario, el desarrollo vascular, la floración, la formación del fruto hasta tropismos como el fototropismo, y el geotropismo, entre varios más (Ruiz Rosquete et al., 2012; Perrot-Rechenmann, 2010). De entre todas las auxinas, el AIA es el más estudiado (Eckardt, 2001) y su homeostasis, que comprende la biosíntesis, almacenamiento, transporte, conjugación para su posterior uso o para su degradación han sido el foco de estudio en diversos laboratorios debido a que dichos mecanismos controlan el desarrollo de las plantas así como su capacidad para adaptarse y responder a diferentes estímulos (Xu et al., 2010).

1.4.1. Biosíntesis

El inicio del proceso de la homeostasis del AIA es la biosíntesis *de novo*, por lo que estudiar las rutas metabólicas de esta molécula es de gran importancia; la biosíntesis del AIA se lleva a cabo a través de la vía del shikimato, cuyo principal precursor es el triptofano. De las cinco vías de biosíntesis del AIA, cuatro son dependientes de triptofano, las cuales son nombradas por el principal intermediario de la ruta. Así tenemos las vías de

la indol-3-acetaldoxima (IAOx), del ácido indol-3-pirúvico (IPyA), de la triptamina (TRA) y la de la indol-3-acetamina (IAM; Fig. 1.2) (Matthes et al., 2019; Brumos et al., 2018; Nonhebel, 2015; Brumos et al., 2014; Gao y Zhao, 2014; Tivendale et al., 2014; Zhao, 2014; Korasick et al., 2013; Ljung, 2013).

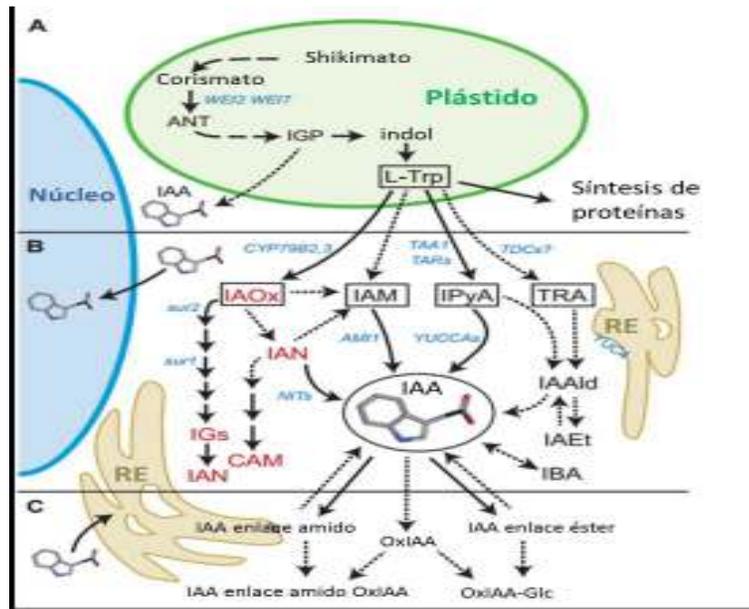


Figura 1.2. Rutas de metabolismo del AIA en las plantas superiores. A) La biosíntesis del IGP y del L-Trp, precursores del AIA, se lleva a cabo en los plástidos. La biosíntesis del L-Trp, el mayor precursor del AIA, se lleva a cabo por la vía del shikimato. B) Los siguientes pasos de la biosíntesis del AIA dependiente de L-Trp se llevan a cabo en el citoplasma. Se muestran cuatro rutas de biosíntesis de AIA dependientes de L-Trp en las plantas superiores: las rutas IAOx, IAM, IPyA y TRA. Las enzimas conocidas se muestran en azul. Los intermediarios que también actúan como precursores y productos de degradación de compuestos de defensa (tales como IGs y CAM) están en rojo. (C) Rutas para la degradación y conjugación del AIA. El AIA puede ser conjugado a aminoácidos y azúcares, o catabolizado para formar oxIAA. Algunos conjugados del AIA pueden ser vistos como una forma de almacenamiento que más tarde puede ser hidrolizada a la forma libre AIA. Las flechas sólidas muestran rutas en las cuales las enzimas, genes o intermediarios son conocidos. Las flechas cortadas indican vías que no están bien definidas. ANT, antranilato; CAM, camalexina; Glu, glucosa; IAAlde, indol-3-acetaldehído; IAET, indol-3-etanol; IAM, indol-3-acetamida; IAN, indol-3-acetonitrilo; IAOx, indol-3-acetaldoxima; IBA, ácido 3-indol butírico; IGP, indol-3-glicerol fosfato; IGs, indol glucosinolatos; IPyA, ácido 3-indol pirúvico; L-Trp, L-triptofano; NITs, nitrilasas; oxIAA, ácido 2-oxoindol-3-acético; TDCs, triptofano decarboxilasas; TRA, triptamina. Redibujado de Ljung (2013).

En la ruta de la IAOx, una citocromo P450 monooxigenasa realiza la conversión del triptofano a IAOx, a partir de este punto dicha ruta puede bifurcarse hacia indol-3-acetonitrilo o indol-3-acetamina finalmente el AIA es obtenido a través de una hidrólisis mediada por nitrilasas (NIT1, 2, 3) (Fig. 1.2).

La triptofano transaminasa es la enzima principal en la vía del ácido indol-3-pirúvico (IPyA), mediante la transaminación, el L-Trp es convertido a indol piruvato el cual es el sustrato de la enzima IPyA descarboxilasa convirtiéndolo en indol 3-acetaldehído y finalmente la hidrogenación de dicho aldehído, mediada por la enzima 3-acetaldehído deshidrogenasa, produce el AIA (Fig. 1.2).

El primer paso de la biosíntesis del AIA por la vía de la triptamina esta mediada por la triptofano descarboxilasa que produce la triptamina, el siguiente paso es catalizado por la amino oxidasa, que da origen al indol-3-acetaldehído y finalmente esta molécula es transformada a AIA por la enzima indol-3-acetaldehído deshidrogenasa (Fig. 1.2).

1.4.2. Transporte

El transporte del AIA es un proceso muy importante para su homeostasis. Este proceso es mediado por los transportadores PIN o ABC. Una muy pequeña parte del transporte del AIA se lleva a cabo de forma pasiva (Fig. 1.3).

El modelo quimiosmótico enfatiza la importancia de la posición de las proteínas transportadoras de auxina, por lo que éstas han sido el blanco de investigaciones muy intensas (Borghetti et al., 2019; Fukui y Hayashi, 2019; Barbosa et al., 2018). El primer miembro identificado de esta familia fue *PIN1*, gracias a estudios en mutantes de *A. thaliana* las cuales no desarrollaban correctamente órganos florales, generando un tallo en forma de alfiler (*pin* en inglés, de ahí el nombre del transportador) (Okada et al., 1991). Estos resultados enfatizaron la correcta predicción de la hipótesis quimiosmótica puesto que las proteínas PIN tenían una localización asimétrica en las células y su posición correlaciona con el flujo de auxina (Friml y Palme, 2002; Okada et al., 1991). La localización diferencial de las proteínas PIN determina la dirección del flujo de auxina requerida para los diferentes procesos, tales como el desarrollo del embrión, la organogénesis, y diferentes tipos de tropismos entre otros (Benková et al., 2003; Friml et

al., 2003; Bruinsma y Hasegawa, 1990) (Fig. 1.3).

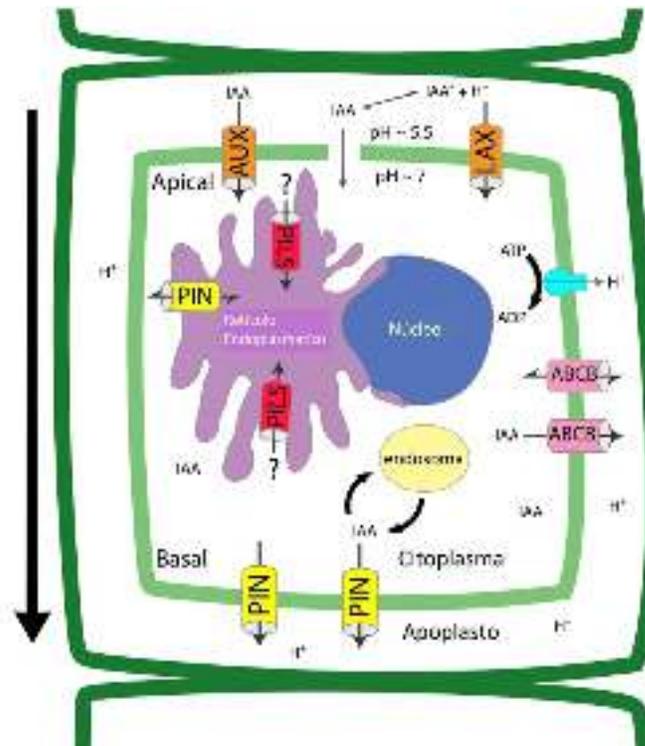


Figura 1.3 Proteínas que regulan el flujo de auxina intracelular y de célula-célula. Cuando se encuentra en forma desprotonada el AIA cruza la membrana plasmática (MP) a través de transportadores., Los transportadores PIN se localizan en la MP y en el retículo endoplásmico (RE). Cuando el AIA se encuentra protonado, éste pasa la MP en forma pasiva. La localización coordinada de los diferentes transportadores determinan la dirección del flujo de auxina. Redibujado de Balzan et al. (Balzan et al., 2014).

De acuerdo con sus secuencias de aminoácidos los transportadores PIN son proteínas integrales del plasmalema, que cuentan con dos dominios hidrofóbicos de aproximadamente cinco hélices transmembranales cada uno, separados por un dominio hidrofílico central citosólico, la estructura de los dominios hidrofóbicos está conservada, por el contrario el dominio hidrofílico es más divergente, sin embargo, los miembros del mismo grupo tienen secuencias muy similares (Krecek et al., 2009). Aunque las proteínas PIN tienen la característica de ser transmembranales pueden ser reacomodadas en respuesta a estímulos externos a otros sitios de la célula mediante un mecanismo cíclico

entre la membrana plasmática (MP) y los endosomas que involucra su fosforilación (Barbosa et al., 2018; Geldner et al., 2001).

En *A. thaliana*, la familia PIN está formada por ocho miembros, los cuales se dividen en dos subfamilias de acuerdo al tamaño del dominio central hidrofílico. La subfamilia que cuenta con dominio hidrofílico amplio son aquellas que se localizan en la MP (PIN 1-4 y 7), el segundo grupo cuenta con un dominio más estrecho (PIN 5 y 8) y se localizan en el lumen del retículo endoplásmico (RE) controlando la disponibilidad y distribución intracelular de auxina (Mravec et al., 2009) (Fig. 1.3).

Recientemente se han identificado proteínas homólogas y con una topología similar a las proteínas PIN llamadas PILS ubicadas también en el RE, sin embargo, su funcionamiento no es claro todavía, aunque se piensa que tienen una función reguladora en el metabolismo de las auxinas puesto que afectan las relaciones de AIA libre y conjugado (Barbez et al., 2012); sin embargo, a pesar de tener una estructura predicha y posiblemente función similares, los análisis filogenéticos permiten concluir que estas proteínas parecen ser más antiguas que los transportadores PIN (Feraru et al., 2012).

Si bien el conocimiento que se tiene de estas proteínas ha sido gracias a estudios realizados con mutantes de *A. thaliana*, sabemos que no todas las especies pueden ser manipuladas genéticamente. La disponibilidad de compuestos que alteran el transporte del AIA ha sido de gran ayuda para la obtención de nueva información en este campo. La identificación y caracterización funcional de estas proteínas ha sido facilitado, en gran medida, por el uso de inhibidores del transporte tales como el ácido *N*-naftiltalámico (NPA) y el TIBA (Márquez-López et al., 2018; Scanlon, 2003; Mattsson et al., 1999).

Los transportadores ABC son una gran familia de proteínas transmembranales que están asociadas con el movimiento de un importante número de moléculas pequeñas y nutrientes; en las plantas están involucradas en el transporte de RCV, lípidos, metales, metabolitos secundarios, y xenobióticos, además de participar en las interacciones planta-patógeno y en la modulación de canales iónicos (Cho et al., 2014; Lee y Cho, 2014; Lee et al., 2008).

Las proteínas ABCB, a diferencia de los transportadores PIN, se localizan en la MP de

una manera no polar, debido a que se anclan de forma estable y su distribución no cambia por estímulos, ni externos ni internos, sin embargo, sirven como transportadores basales para la regulación de la homeostasis intracelular del AIA (Fig. 1.3). Estudios realizados en plantas, con la pérdida de la función de los genes que codifican para estas proteínas, mostraron que el contenido de AIA libre y el transporte de polar se encuentran severamente reducidos (Geisler et al., 2005; Noh et al., 2001).

1.4.3. Mecanismo de activación, desactivación y degradación del AIA

El almacenamiento o conjugación es sinónimo a desactivar a la molécula de AIA, esta acción es mediada por las enzimas GH3. La liberación del AIA de los aminoácidos o carbohidratos es antónimo de la conjugación, sin embargo, esto solo sucede con los conjugados AIA-Ala y AIA-Leu. La conjugación con el resto de amino ácidos y carbohidratos son el inicio de la degradación del AIA (González-Lamothe et al., 2012; Davies et al., 1999).

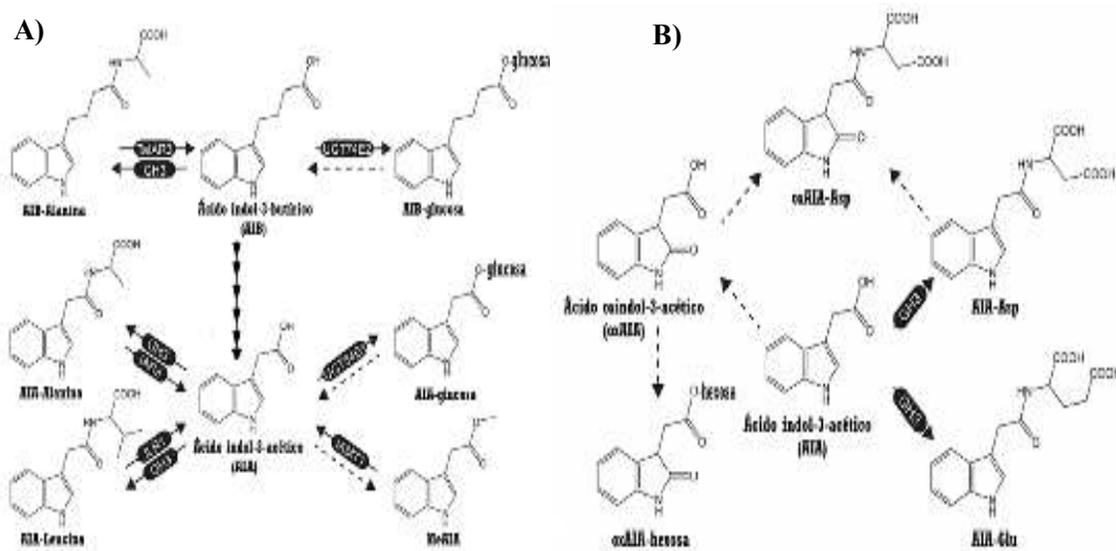


Figura 1.4. Principales conjugados de AIA. A) conjugados de reserva de AIA mediados por las GH3 y las amidohidrolasas ILR1 e IAR3 como las principales enzimas encargadas de activar al AIA. B) ruta de degradación del AIA. Figura modificada de Couh Dzul (2017).

Aproximadamente el 90% del AIA se encuentra conjugado por lo que solo una pequeña parte se encuentra libre en zonas de constante desarrollo (Campanella et al., 2004). La

conjugación se lleva a cabo mediante la formación de enlaces entre el grupo ácido del AIA y el grupo amino de los aminoácidos o un oxhidrilo de un carbohidrato. Los genes GH3, que codifican para las enzimas que llevan a cabo la reacción responden a la presencia de auxinas en el tejido (Wang et al., 2008; Staswick et al., 2005; Hagen y Guilfoyle, 1985; Hagen et al., 1984).

Dichos conjugados, unidos covalentemente a compuestos de baja masa molecular, están protegidos de rupturas oxidativas por lo que su liberación es realizada por enzimas hidrolíticas para suplir las demandas de la planta o para ser degradados (Bajguz y Piotrowska, 2009). Se ha estudiado muy poco sobre las rutas de degradación del AIA o de las auxinas en general, sin embargo, estudios previos abrieron un pequeño campo de visión sobre la degradación de esta molécula, es por ello que se sabe que la conjugación del AIA con el ácido aspártico y del AIA con el ácido glutámico marca el inicio de la degradación, dicho proceso es totalmente irreversible (Campanella et al., 2011) y puede darse de dos formas, ya sea por oxidación descarboxilativa o por una oxidación sin descarboxilación.

La liberación de los conjugados de AIA fue descubierto por Bartel y Fink (1994), el gen mutante que se utilizó en *A. thaliana* era sensible a AIA-Leu. Mediante esta técnica Bartel y Fink lograron aislar al grupo de genes ahora denominados ILLRI (por su nombre del inglés, IAA-Leucine-Resistant) dentro de este grupo de genes se encuentran los genes ILRI, ILLI e ILL2. Pocos años después Davies et al. (1999) usando una técnica similar lograron identificar a los genes IAR3 (por su nombre del inglés, IAA-Ala-Resistant), ILL3 y al pseudogen de IAR3 (ILL5 80% similitud, ubicación cercana al cromosoma I de *A. thaliana*).

Se conoce la especificidad de la amidohidrolasa IAR3 en *A. thaliana* gracias a los trabajos realizados por LeClere et al. (2002), mediante el análisis *in vitro* de la especificidad sobre el sustrato, la K_M calculada resultó tener un rango micro molar (LeClere et al., 2002), mientras que los ortólogos de IAR3 tuvieron grandes diferencias en otras especies, por ejemplo, en *Triticum aestivum* el ortólogo de IAR3 solo hidroliza conjugados de AIA-Ala en cantidades extremadamente pequeñas (Campanella et al., 2004). Por otro lado, las

características del gen IAR3 son bastante peculiares ya que es el único gen más conservado respecto a los demás que codifican para amidohidrolasas por lo que la amidohidrolasa IAR3 que se localiza en el RE es muy similar a los encontrados en otras especies, sin embargo, su especificidad por el sustrato no es la misma (Takahashi y Takamizo, 2012; Campanella et al., 2003; LeClere et al., 2002).

1.5. EFECTO DE LAS HIDROLASAS DURANTE LA ES EN *C. CANEPHORA*

En nuestro laboratorio se realizó el estudio de la expresión de los genes que codifican para las amidohidrolasas encargadas de liberar el AIA durante la inducción de la ES en *C. canephora*. Se determinó que el gen que codifica para la amidohidrolasas IAR3 se expresa durante la inducción de la ES y en las 24 horas posteriores (Fig. 1.5).

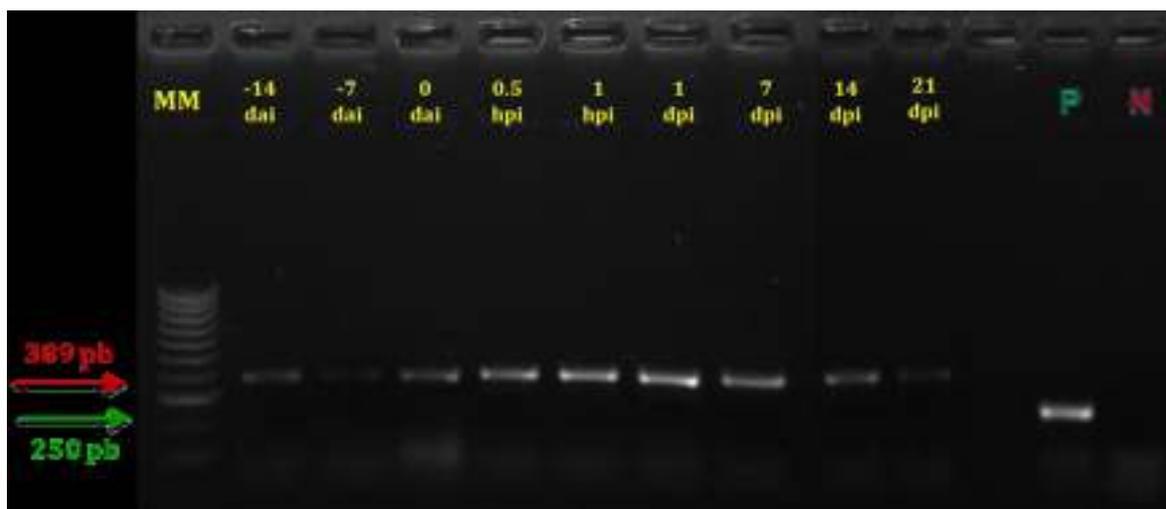


Figura 1.5. Perfil de expresión del gen IAR3. Etapa de pre-acondicionamiento: -14 días antes de la inducción (dai), -7 dai, 0 dai. Etapa de la Inducción: 0.5 horas después de la inducción (hpi), 1 hpi, 1 día o días después de la inducción (dpi), 7 dpi, 14 dpi, 21 dpi. Flecha roja: fragmento amplificado de 390 pb. Flecha verde: testigo positivo del gen que codifica a la actina (250 pb). P: testigo positivo. N: testigo negativo (Avilez-Montalvo, 2015).

La ILR1 de *A. thaliana* libera AIA, en *C. canephora*, dicho gen se expresa durante diversas etapas de la ES, en el carril 1 de la Fig. 1.6, el día -14, el gen de ILR1 mostró mayor expresión con respecto al periodo de pre-acondicionamiento, así como durante los primeros 14 días después de la inducción de la ES.



Figura 1.6. Perfil de expresión de ILR1 durante la embriogénesis somática en *C. canephora*. Etapa de pre acondicionamiento: -14 días antes de la inducción (dai), -7 dai, día 0 dai. Etapa de inducción: 0.5 horas después de la inducción (hpi), 1 hpi, 1 día o días posterior a la inducción (dpi), 7 dpi, 14 dpi, 21 dpi. dpi: días posteriores a la inducción. Flecha azul: fragmento del gen ILR1 amplificado a un tamaño de 780 pb. Flecha verde: testigo positivo del gen que codifica a la actina (250 pb). P: testigo positivo. N: testigo negativo (Avilez-Montalvo, 2015).

1.5.1. Secuenciación de IAR3

Para corroborar la identidad del gen IAR3 se llevó a cabo su secuenciación (Fig. 1.7). Cuando la secuencia del gen clonado se comparó con la secuencia del genoma secuenciado de *C. canephora* (Denoeud et al., 2014). Como puede apreciarse en la Fig. 1.7 las secuencias del gen clonado en nuestro laboratorio y la reportada en la secuenciación del genoma de *C. canephora* son iguales.

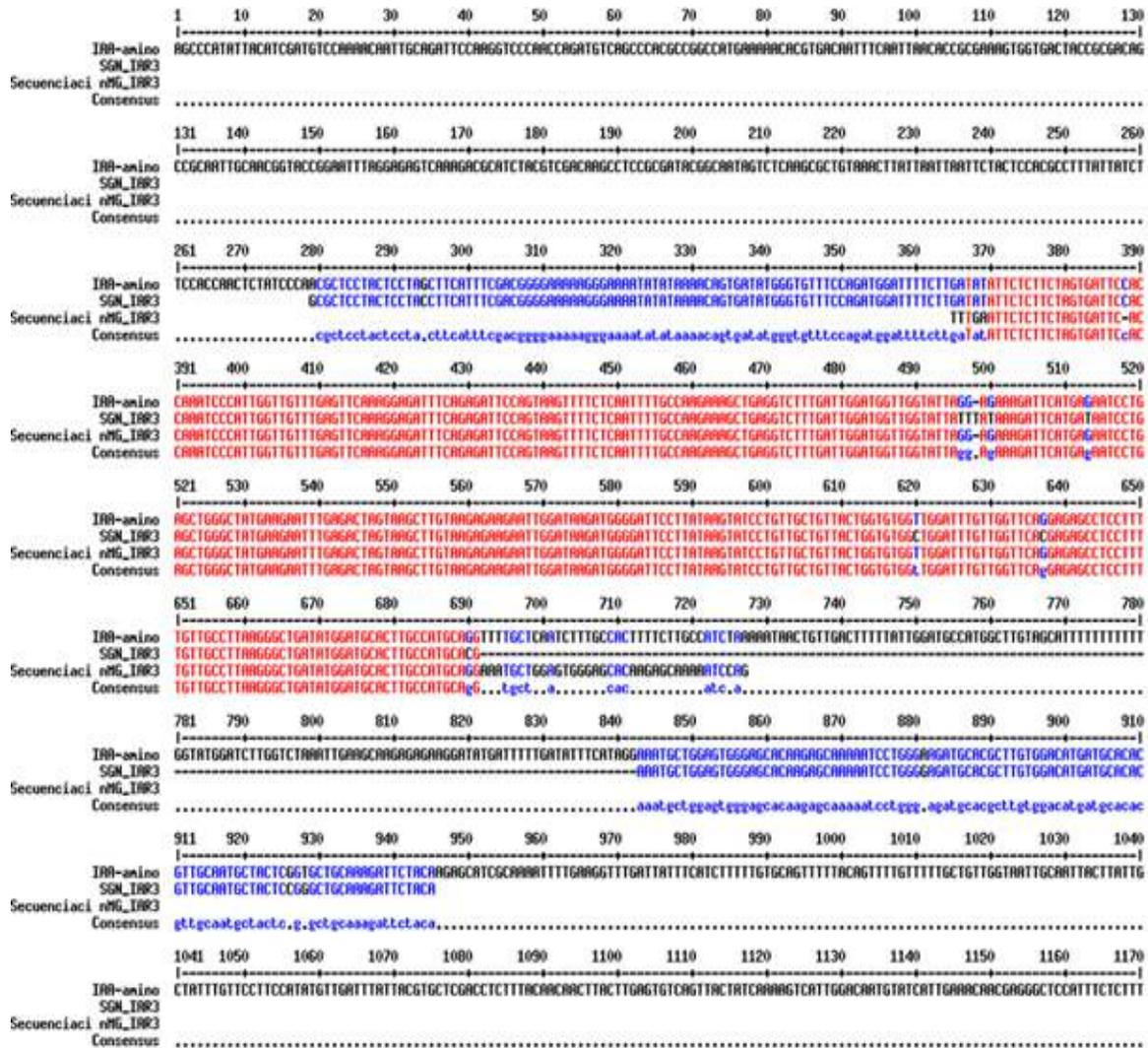


Figura 1.7. Secuencia de IAR3. Comparación de la secuencia de gen completo de *C. canephora* IAR3 de la muestra secuenciada, mediante el alineamiento con la secuencia IAR3 de la base de datos Sol Genomics Network (Avilez-Montalvo, 2015).

La proteína recombinante obtenida fue recuperada de los cuerpos de inclusión y se realizó una purificación previa a través de una columna de níquel (Cough Dzul, 2017) para después realizar el análisis por electroforesis y Western blot con anticuerpos monoclonales contra histidina con el fin de confirmar si se logró expresar el gen de la IAR3, así como la purificación de la proteína (Fig. 1.11).

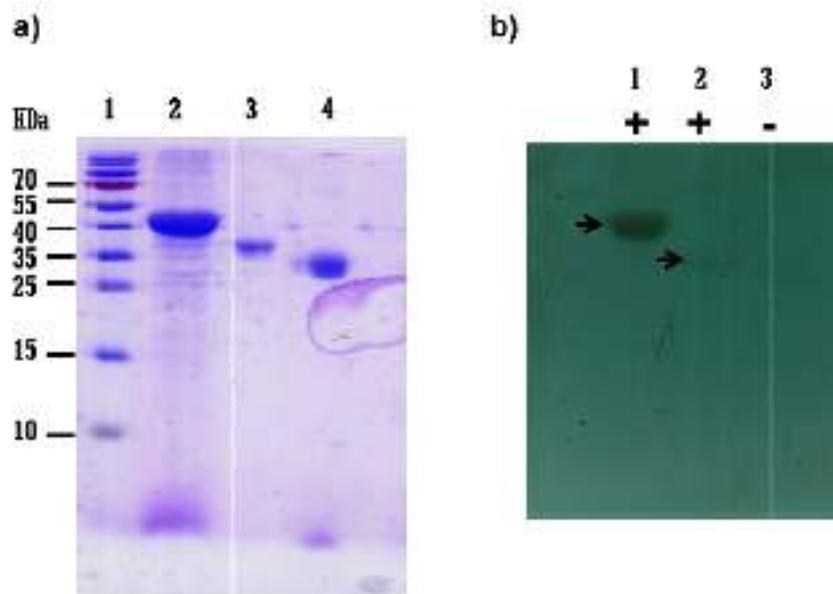


Figura 1.11. Análisis para confirmar la obtención de IAR3. a) Gel SDS-PAGE. Carril 1: marcador molecular; carril 2: proteína pura de His-CclAR3-3; carril 3: proteína His.TIM (Triosa fosfato isomerása); carril 4: TIM sin la etiqueta de histidina. A partir de este gel se realizó el western blot **b)** Western blot. Carril 1: His-CclAR3-3 (positivo); carril 2: His-TIM (positivo); carril 3: TIM sin la etiqueta de histidinas (negativo) (Cough Dzul, 2017).

1.6.2 Sustratos de la amidohidrolasa IAR3

Generalmente los miembros de la familia de las amidohidrolasas (peptidasas M20D “IRL1”) suelen tener afinidad a más de un conjugado o sustrato (AIA-Aminoácido), este

fenómeno bioquímico se debe a que ciertos sitios en la secuencia de aminoácidos de la cadena polipeptídica (sitios catalíticos y no catalíticos) se encuentran en gran parte conservados (Fig. 1.12), por ejemplo: los aminoácidos en los sitios 103 y 143 se conservan entre IAR3 y sILR1, así como también en ILL1, ILL2, ILL3 e ILL5, sin embargo, la afinidad por los sustratos no es la misma, debido al fenómeno inverso mencionado anteriormente (sitios no conservados) (Campanella et al., 2003), por ejemplo, las enzimas IAR3 e ILR1 son capaces de hidrolizar el conjugado de AIA-Leu en *A. thaliana* (Rampey et al., 2004) aunque la enzima ILR1 tiene mayor afinidad por dicho sustrato que IAR3 debido a los sitios en los que difieren en la secuencia de aminoácidos de estas dos enzimas; otro ejemplo similar lo encontramos cuando comparamos IAR3 con ILL2, ya que ambas enzimas prefieren hidrolizar al conjugado AIA-Ala aunque en este caso IAR3 tiene mayor afinidad que ILL2. Así, podemos afirmar que es normal encontrar que una enzima tenga un sustrato preferido y que comparta el mismo sustrato con otro miembro de la misma familia, aunque es importante resaltar que esto suele modificarse en menor grado dependiendo de la especie vegetal, un ejemplo importante es la IAR3, que en *A. thaliana*, es capaz de hidrolizar los conjugados de AIA-Ala (4.6 ± 0.6 pmol de AIA liberado por min^{-1} mg^{-1} de proteína) siendo dicho conjugado el sustrato ideal y AIA-Gly de manera eficiente (2.4 pmol de AIA liberado por min^{-1} mg^{-1} de proteína) así como AIA-Phe, AIA-Leu y AIA-Val en menor medida, (Davies et al., 1999). En otras especies vegetales, tales como *Brassica rapa* y *M. truncatula* la enzima IAR3 es capaz de hidrolizar los conjugados de AIA-Ala, AIA-Gly y AIA-Asp (Savic et al., 2009; Campanella et al., 2008).

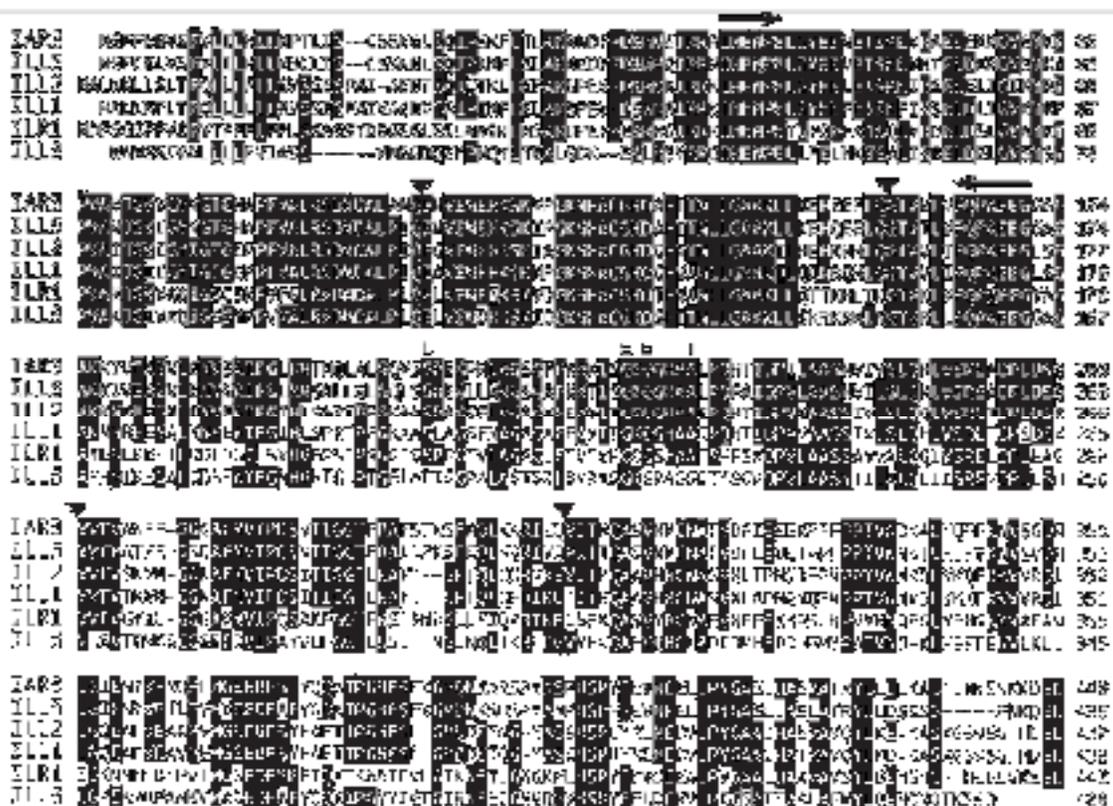


Figura 1.12. Secuencias conservadas en la cadena polipeptídicas de seis amilohidrolasas capaces de liberar los conjugados de AIA con aminoácidos. Las regiones sombreadas muestran las similitudes siendo lo contrario en las regiones no sombreadas (Davies et al., 1999).

De acuerdo a los datos mencionados anteriormente es importante determinar la especificidad de la enzima IAR3 para los diferentes sustratos posibles durante la inducción de la ES en *C. canephora*.

1.7. JUSTIFICACIÓN

El mecanismo de acción de la amilohidrolasa IAR3 sobre los conjugados de AIA con alanina o leucina, representa una de las principales formas de regular las concentraciones del AIA, esencial para el desarrollo y la supervivencia de las plantas, incluyendo *C. canephora*.

Al utilizar técnicas de purificación y de determinación de afinidad de la enzima por el sustrato, nos permitirá visualizar un panorama completo sobre la acción, no solo de la

proteína IAR3, sino también a los miembros que forman el grupo familiar de las amidohidrolasas capaces de hidrolizar conjugados de AIA para suministrar a la planta de dicha molécula.

Dichos estudios serán un avance importante para entender los procesos bioquímicos y moleculares llevadas a cabo en las células vegetales que inducen la diferenciación de la misma para generar una nueva planta.

1.8. OBJETIVO GENERAL

Realizar la caracterización bioquímica de la amidohidrolasa IAR3 de *C. canephora* encargada de liberar los conjugados de AIA-aminoácido mediante el análisis cinético.

1.9. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la afinidad de la enzima IAR3 por los conjugados de AIA con aminoácidos.
- Determinar la especificidad de IAR3 por los conjugados de AIA-aminoácido.

1.10. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

- ¿Cuál es el sustrato preferido por la enzima IAR3 de *C. canephora*?

1.11. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Estrategia experimental de la caracterización bioquímica de la amidohidrolasa IAR3.

Etapas 1. Transformación y cultivo de las cepas de *E. coli* HST08 y Rosetta 2(DE3)



Transformación de la cepa de *E. coli* HST08 con el plásmido pETIAR3-3



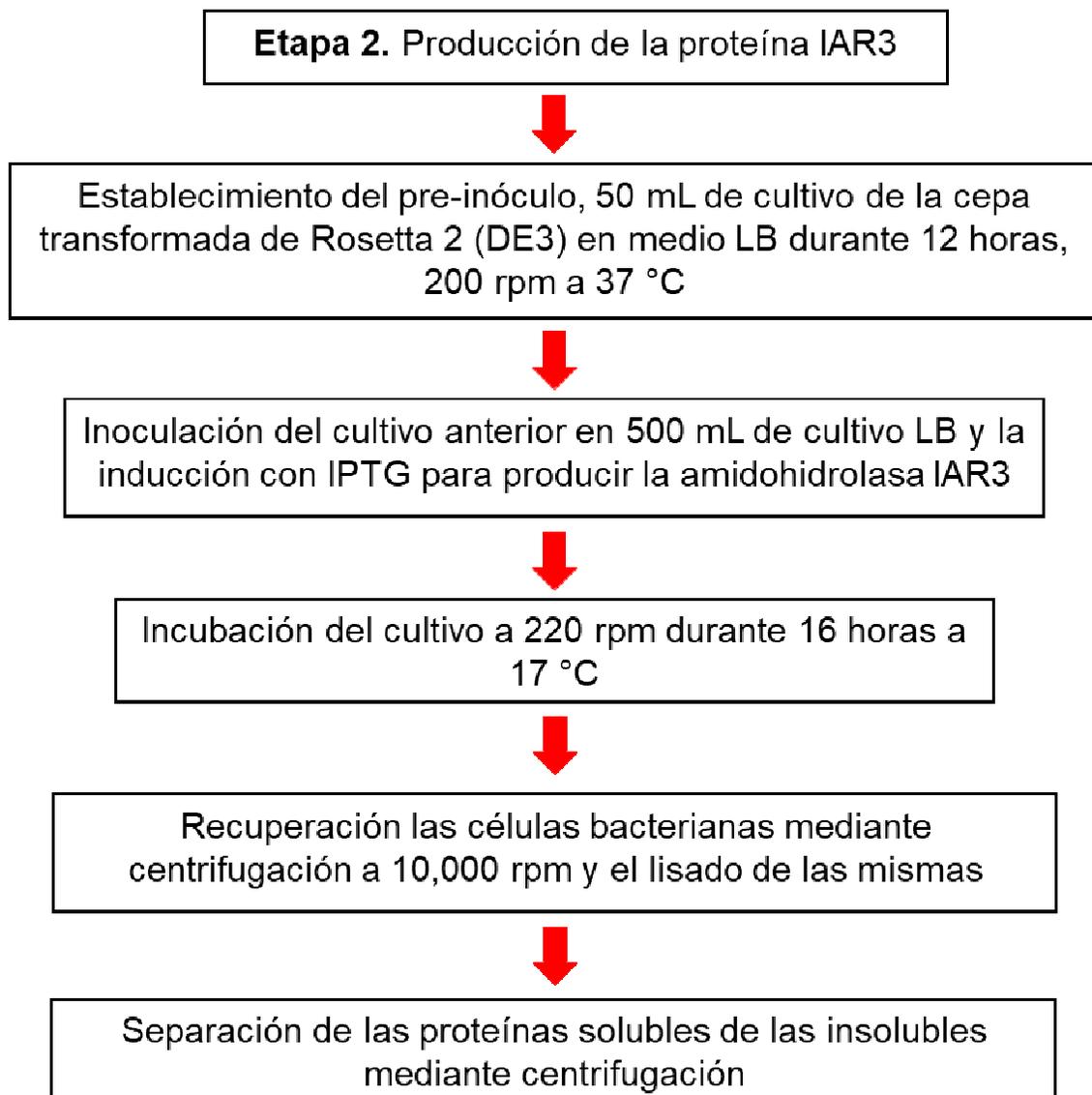
Cultivo de HST08 transformada en medio LB

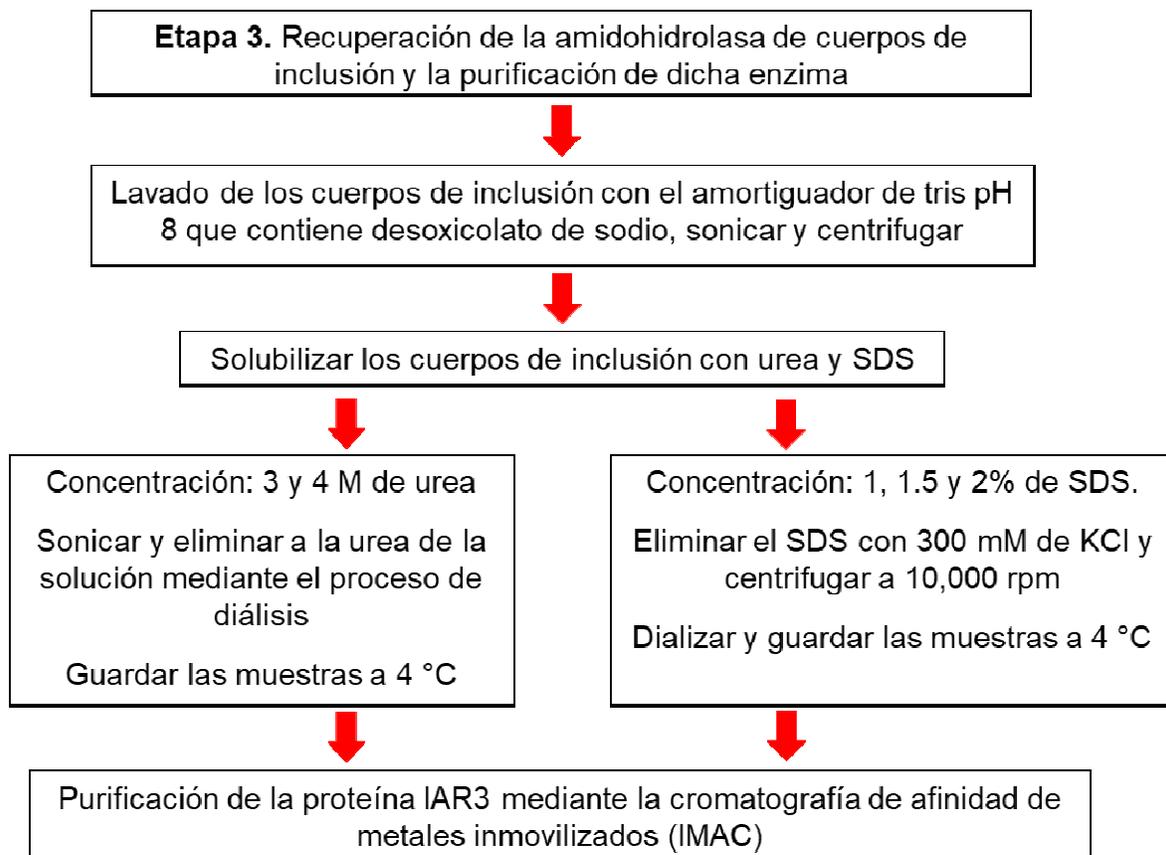


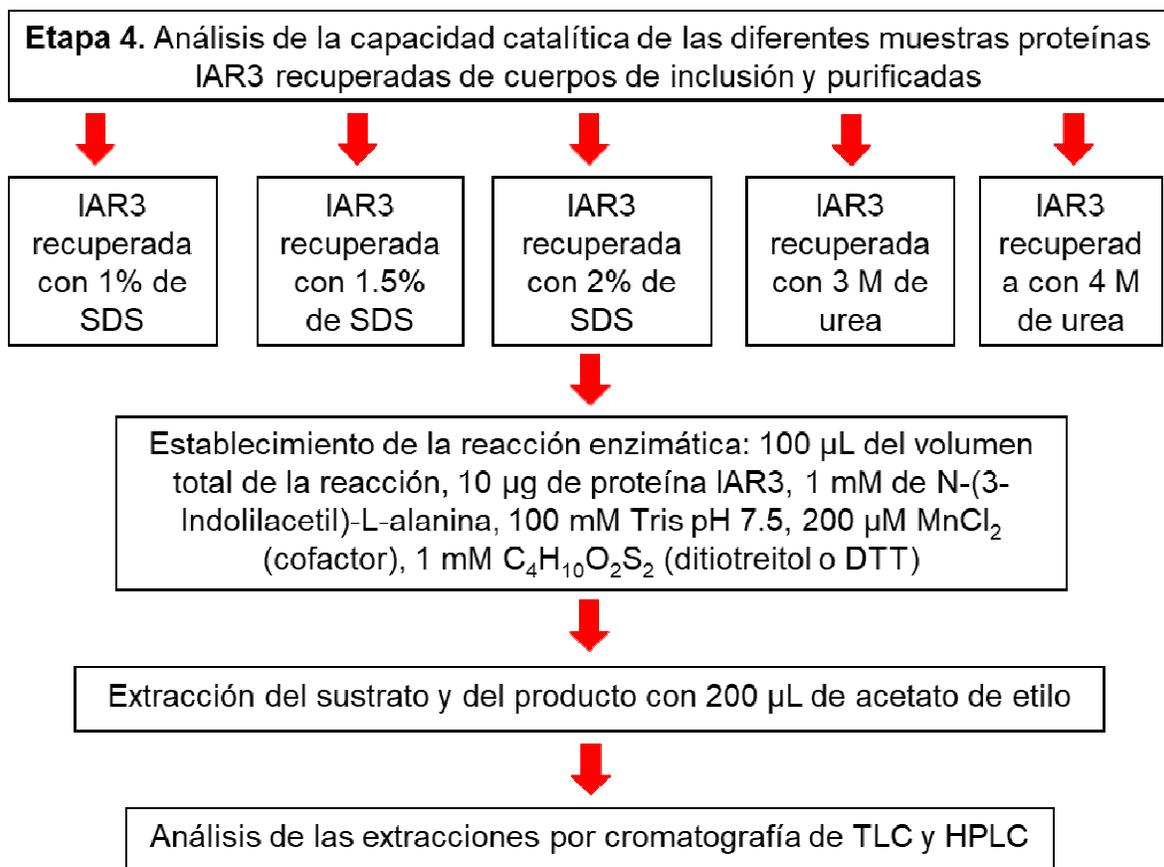
Extracción de ADN (plásmidos de pETIAR3-3)



Transformación de las cepas de *E. coli* Rosetta 2 (DE3) con el plásmido pETIAR3-3







CAPÍTULO II

PROTOSCOLOS PARA LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNA RECOMBINANTE IAR3, SU PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA

2.1. INTRODUCCIÓN

Las auxinas son uno de los RCV que están presentes en diversos procesos fisiológicos de la planta, cualquier alteración provoca cambios significativos en su desarrollo (Ljung, 2013; Su y Zhang, 2009; Quiroz-Figueroa et al., 2006b; Lange et al., 1994; Hatanaka et al., 1991), dichos reguladores se encuentran mayormente en forma de conjugados con aminoácidos o carbohidratos, las cuales pueden servir como reserva de auxinas o pueden servir para degradar al RCV al momento de la hidrólisis mediada por las amidohidrolasas, enzimas encargadas de liberar a la auxina (Korasick et al., 2013; Ljung, 2013; Schuller y Ludwig-Müller, 2006). Estas enzimas se han podido determinar durante la ES del cafeto (Avilez-Montalvo, 2015), es por ello que se procedió a caracterizar a dichas proteínas para determinar las propiedades de la enzima al momento de interactuar con sus sustrato (Schuller y Ludwig-Müller, 2006; Campanella et al., 2004; Davies et al., 1999).

Existe evidencia que sugieren que amidohidrolasas como la IAR3 suelen tener afinidad por más de un conjugado (Widemann et al., 2013; Bitto et al., 2009; Schuller y Ludwig-Müller, 2006; Campanella et al., 2003; Davies et al., 1999), sin embargo, también se han encontrado que tienen mayor afinidad por AIA-Ala. Por ello en este trabajo se determinará él o los sustratos de la IAR3 de *C. canephora* durante la ES (Campanella et al., 2003), para ello se realizará la identificación de los conjugados de auxina presentes durante la ES así como su cuantificación, estos datos nos sugerirán que conjugados se deben utilizar para realizar los ensayos enzimáticos con la proteína recombinante previamente purificada.

La caracterización de las amidohidrolasas en nuestro laboratorio se inició hace algunos

años (Avilez-Montalvo, 2015). En dichos estudios se determinó que durante la inducción de la ES en *C. canephora* se expresan seis genes de la familia de las amidohidrolasas, entre ellas la IAR3. A continuación se trabajó en la construcción del vector de expresión para poder expresar dicho gen en un sistema recombinante (Cough Dzul, 2017). Si bien se logró expresar el gen de la IAR3, no se logró purificar totalmente a la proteína IAR3. Por ello en este trabajo se pretende en primer lugar purificar a dicha proteína.

En este apartado se muestran los protocolos utilizados para realizar la purificación de la proteína IAR3. Es importante mencionar que los cambios en las condiciones de cultivo, las concentraciones de los reactivos, así como la incorporación de nuevos reactivos, fueron necesarios para obtener la proteína pura. También se enlistan los protocolos para la cuantificación de la proteína que se está purificando, así como el protocolo para la determinación de la actividad catalítica, ya que durante el proceso de purificación, las proteínas con características enzimáticas suelen perder capacidad catalítica (Widemann et al., 2013; Schuller y Ludwig-Müller, 2006; Campanella et al., 2003; LeClere et al., 2002).

2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1. Lisis alcalina de *E. coli* HST08

2.2.1.1 Materiales

2.2.1.1.2. Material biológico

1. *E. coli* cepa HST08.
2. Plásmido petIAR3-3.

2.2.1.1.3. Instrumentación

1. Materiales para preparar el medio LB selectivo de mantenimiento para bacterias *E. coli* (HST08) transformadas con el plásmido petIAR3-3: vaso de precipitados de 100 mL, micropipetas de 10 μ L y 200 μ L, probetas de 100 mL, potenciómetro (OHAUS), cajas de Petri, autoclave, campana de flujo laminar, incubadora (37 °C)

y refrigerador.

2. Materiales para preparar el medio LB para la producción de plásmidos en células de *E. coli* HST08: vaso de precipitados de 100 mL, micropipetas de 10 μ L y 200 μ L, probetas de 25 mL, tubos de ensayo de 15 mL con tapas, potenciómetro (OHAUS), autoclave, campana de flujo laminar, incubadora en agitación (Orbit Environ Shaker y refrigerador).
3. Materiales para la lisis alcalina de células de *E. coli* (HST08): 5 mL de cultivo (medio Lb) de *E. coli* (HST08) con ampicilina, tubos de microcentrífuga, centrífuga, tubos Eppendorf de 1.5 mL, micropipeta de 20 μ L y refrigeradores de 4 °C y -20 °C.

2.2.1.1.4 Reactivos y soluciones

1. Medio LB: 10 g L⁻¹ de bacto triptona, 5 g L⁻¹ extracto de levadura, 85.558 mM NaCl, 15 g L⁻¹ de agar bacteriológico, 100 μ g mL⁻¹ de ampicilina y H₂O, pH 7.5.
2. Reactivos para la lisis alcalina de células de *E. coli* (HST08): solución I esterilizar en autoclave y guardar a 4 °C (50 mM de glucosa, 25 mM de TRIS base pH 8, 10 mM de EDTA pH 8) (**Nota 1**). Solución II, preparar 1 mL al instante a temperatura ambiente (2 N de NaHO, 1 % [m/v] de SDS) (**Nota 2**). Solución III, preparar 100 mL y guardar a 4 °C (5 M de KC₂H₃O₂, 11.5 mL CH₃COOH) (**Nota 3**), 700 μ L (CH₃)₂ CHOH, 500 mL de etanol al 70 % y 10 μ g mL⁻¹ de RNAsa.

2.2.1.1.5 Metodología

La cepa HST08 fue transformada con el plásmido petIAR3-3 que contiene el gen IAR3Cc, dicha transformación fue realizada por Couh Dzul (2017).

Medio LB. Se prepararon 100 mL del medio LB, para ello se pesó 1 g de bacto triptona, 0.5 g de extracto de levadura y 0.5 g de NaCl, dichos reactivos fueron disueltos en 50 mL de H₂O destilada (**Nota 4**), posteriormente se aforó a 95 mL y se ajustó el pH 7.5 con NaOH (**Nota 5**), después el volumen se llevó a 100 mL, a partir de ahí se tomaron 20 mL del medio líquido y se distribuyeron en cuatro tubos de ensayo de vidrio con tapas en volúmenes iguales, a los 80 mL de medio restante se les agregó agar bacteriológico a una

concentración de 15 g L^{-1} (**Nota 6**) y se pasó a un matraz Erlenmeyer de 250 mL (**Nota 6**), después se procedió a esterilizarlos. Al finalizar la esterilización a los medios de cultivo se les agregó la ampicilina en campana de flujo laminar hasta una concentración de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ (**Nota 7**). Posteriormente, el medio semisólido se pasó a cuatro cajas de Petri estériles en volúmenes iguales y se esperó a que dicho medio se terminara de enfriar para poder sembrar las bacterias de la cepa HST08.

Cultivo de la cepa HST08. Una alícuota de la cepa HST08 transformada con el plásmido petIAR3-3 se descongeló en hielo y se tomaron 100 μL de la alícuota y se diluyó en 900 μL de medio LB líquido estéril previamente preparado (**Nota 8**), después se tomaron 100 μL de la dilución 1:10 y se distribuyó en una caja de Petri que contenía el medio LB semisólido con la ayuda de una aza bacteriológica estéril (**Nota 9**). Posteriormente el cultivo fue incubado a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 12 horas, al finalizar dicho periodo, se aisló una colonia con la ayuda de un palillo estéril en la campana de flujo laminar (**Nota 10**) y se colocó en el medio líquido previamente preparado, dicha siembra fue cultivada a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ con una agitación de 200 rpm (Orbit Environ Shaker) durante 12 horas, al finalizar dicho periodo se realizó la lisis alcalina.

Lisis alcalina. La extracción del plásmido petIAR3-3 de las bacterias HST08 se realizó mediante lisis alcalina, para ello se tomaron 1.5 mL del cultivo previamente mencionado y se colocó en un tubo Eppendorf, después se centrifugó tres veces a 13,000 rpm durante 1 minuto a temperatura ambiente (**Nota 11**), al finalizar la centrifugación se desechó el sobrenadante, la pastilla bacteriana fue resuspendida en 200 μL de amortiguador de lisis (solución I) (**Nota 12**), a continuación se agregaron 200 μL de la solución de lisis (solución II), la mezcla se homogenizó invirtiendo los tubos cinco veces (no utilizar Vortex). Después se dejó a temperatura ambiente por 5 minutos y al finalizar dicho tiempo se incubó en hielo por 2 minutos para agregarle 300 μL de la solución de neutralización (solución III), la cual se homogenizó por inversión y se volvió a incubar en hielo por 15 minutos, al finalizar dicho tiempo el lisado bacteriano se centrifugó a 13,000 rpm durante 10 minutos, el sobrenadante se colocó en un tubo limpio (Eppendorf de 1.5 mL estéril) y se desechó el sedimento, posteriormente al sobrenadante se le adicionaron 700 μL de isopropanol y se mezcló por inversión. Se dejó reposar por 2 minutos a temperatura

ambiente, después se centrifugó a 13,000 rpm en la microcentrífuga durante 10 minutos, al finalizar la centrifugación se desechó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla con 500 μL de etanol al 70%, la pastilla se recuperó a 13,000 rpm, dicho proceso se repitió 2 veces (**Nota 13**), posterior a esto se removió el sobrenadante y se dejó secar la pastilla a temperatura ambiente boca abajo hasta que no quede fluido visible (**Nota 14**), después, la pastilla o ADN plasmídico se disolvió en 50 μL de H_2O y se le agregó 1 μL de RNAsa ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$), finalmente se procedió a homogenizar la mezcla por pipeteo por unos segundos para después incubar el ADN plasmídico durante 30 minutos a temperatura ambiente (**Nota 15**) antes de almacenar el producto obtenido a -20°C .

2.2.1.1.6. Notas

Nota 1. Es necesario tener preparado una solución madre por separado de Tris 2 M y EDTA 0.5 M, ya que también servirá como amortiguador en diversas soluciones. Para ello se preparó 1 L de solución madre de 2 M de Tris base y 500 mL de EDTA a 0.5 M. Para preparar la solución de Tris base, realizar el cálculo necesario para pesar la cantidad adecuada y disolverla en 80% del volumen de agua en relación al volumen total al que se aforará, ajustar el pH 8.0 con HCl, aforar. Esta solución puede ser guardada en un rango de temperatura de 4 a 25°C . La solución madre de EDTA se prepara pesando la cantidad adecuada del reactivo, después se disuelve el reactivo en 80% del volumen al que se aforara y se ajusta el pH a 8 con NaOH, dicha solución debe ser guardada a 4°C y puede tener una viabilidad de hasta 6 meses. Después de tener las soluciones madres de TRIS y EDTA, se procede a preparar la solución amortiguadora, se esteriliza y se guarda a 4°C .

Nota 2. Para la solución de lisis es necesario prepararla media hora antes de ser utilizada y mantenerla a 4°C . Dicha solución debe tener un volumen total de 1 mL compuesto por 20 μL de NaOH (10 N), 100 μL de SDS (10%) y 880 μL de H_2O , esta solución no se puede almacenar más de una hora ya que pierde la capacidad de lisis, es por ello que se recomienda prepararlo al instante.

Nota 3. Para preparar la solución de neutralización, tomar la concentración indicada y mezclarla en 50% de H_2O del volumen total, aforar y esterilizar la solución, al finalizar

guardar a 4 °C.

Nota 4. El medio LB, se puede preparar de la forma como se mencionó en la metodología o se puede comprar el medio ya preparado, lo único que se haría es disolver 20 g/L y ajustar el pH a 7.5.

Nota 5. Para mantener el pH del medio es necesario aforarlo a un volumen cercano al volumen requerido, para que después de aforar no haya un cambio en el pH del medio.

Nota 6. Como se puede observar en la metodología, de un mismo volumen se tomó el medio líquido y el sólido, esto se realizó por dos motivos, 1) para evitar el desperdicio de reactivo y porque no es recomendable guardar los medios más de 24 horas.

Nota 7. Es muy importante mantener la temperatura adecuada para agregar el antibiótico al medio ya que si se agrega cuando el medio tiene una temperatura por arriba de los 37 °C la ampicilina se degrada y por el contrario si lo agregamos cuando está demasiado frío en el medio semisólido, ésta no se logrará disolver de manera homogénea ya que el medio se gelifica, la temperatura adecuada para agregar el antibiótico es de 37 °C, lo único que se tiene que hacer es pegar un termómetro en el matraz para medir la temperatura, por otra parte es muy importante mencionar que el antibiótico se agrega antes de vaciar el medio a otro recipiente, ya sea cajas de Petri o frascos, en cuanto al medio líquido simplemente esperar a que este se enfríe totalmente y en campana agregar la ampicilina.

Nota 8. Las bacterias transformadas con el plásmido petIAR3-3 se conservan a -80 °C en 50% de glicerol. Una vez descongeladas es necesario realizar diluciones de 1:10 con el objetivo de obtener colonias aisladas; por otra parte, cuando se acaba de realizar la transformación y se requiere del cultivo inmediato, es necesario realizar diversas diluciones desde 1:10, 1:100 y 1:1000, esto permite saber en cual dilución se obtienen colonias bacterianas más aisladas, el resto de las bacterias transformadas cultivadas en medio líquido deberán ser guardadas en glicerol al 50% en alícuotas de 1 mL a -80 °C.

Nota 9. Para realizar la siembra de las bacterias se puede utilizar perlas estériles o un asa bacteriológica, ya sea de vidrio tipo L o de una asa clásica de alambrito, en el caso de no contar con ningún tipo de asa bacteriológica se puede improvisar con una punta estéril de

1 mL doblada en forma de L. Lo que se hace es tomar con las manos limpias una punta del extremo superior lugar donde se acopla a la micropipeta y calentar la parte media de la punta en el mechero, posteriormente doblarla sobre la tapa estéril de la caja de Petri y esperar a que se enfríe, luego utilizar la punta con mucho cuidado para no perforar el medio de cultivo.

Nota 10. Se usan palillos de pino, se esterilizan en tubos Falcon (Corning) de 50 mL. También se pueden utilizar puntas de 20 μ L estériles para tomar una colonia aislada con la punta del palillo o punta y se coloca en el medio líquido.

Nota 11. El sobrenadante deberá ser desechado después de finalizar las tres centrifugaciones.

Nota 12. En este paso se puede agregar lisozima para debilitar la membrana bacteriana, esto dependerá del tipo de cepa que se esté utilizando, en el caso particular de este protocolo no fue necesario agregarle dicha enzima.

Nota 13. Desechar el sobrenadante al finalizar cada centrifugación.

Nota 14. Utilizar cuadros pequeños de papel (3 cm²) previamente esterilizado y colocar los tubos Eppendorf boca abajo sobre dichos cuadritos de papel hasta que se sequen completamente en un ambiente estéril.

Nota 15. Es importante incubar las muestras con RNAsa para eliminar los ARN que se encuentren en la muestra, antes de proceder a guardar las muestras.

2.2.2. Preparación de células competentes de *E. coli* Rosetta 2 (DE3) y transformación con el plásmido petIAR3-3

2.2.2.1. Materiales

2.2.2.1.1. Material biológico

1. Bacterias *E. coli* ROSETTA 2 (DE3).
2. Plásmido petIAR3-3.

2.2.2.3 Instrumentación

1. Matraces Erlenmeyer de 250 mL.
2. Palillos estériles.
3. Puntas estériles.
4. Cinco mL de cultivo (medio LB) de *E. coli* (ROSETTA 2 (DE3) con cloranfenicol.
5. Cien mL de medio Lb estéril con cloranfenicol.
6. Incubadora (Orbit Environ Shaker),
7. Espectrofotómetro.
8. Recipiente con hielo.
9. Tubos de centrifuga de 50 mL.
10. Centrifuga.
11. Micropipeta de 1 mL.
12. Tubos Falcon estériles de 15 mL.
13. Tubos Eppendorf estériles de 1.5 μ L.
14. Celdas para espectrofotómetro.
15. Probetas estériles.
16. Ultracongelador -80 °C.
17. Incubadora Kitlab.

2.2.2.4 Reactivos

1. Células competentes.
 2. Medio LB líquido, 34 μ g mL⁻¹ cloranfenicol, 0.1 M CaCl₂, 0.3 mL de glicerol al 50%.
 3. Transformación. Plásmidos petIAR3-3 obtenidos de la lisis alcalina de *E. coli* (HST08), células competentes de *E. coli* ROSETTA 2 (DE3), 1 mL de medio LB líquido sin ampicilina, medio Lb solido con 100 μ g mL⁻¹ ampicilina y 34 μ g mL⁻¹
-

cloranfenicol.

2.2.2.5 Métodos

Cultivo de Rosetta 2 (DE3).

Preparación de medio LB (Luria Bertani Broth). Se realizó la preparación de 200 mL de medio LB sólido con cloranfenicol a una concentración final de $34 \mu\text{g mL}^{-1}$, para ello se pesaron 4 g de medio LB comercial (LB Broth, Sigma-Aldrich) y se diluyeron en 185 mL de H_2O , posteriormente se ajustó el pH a 7.5 y se le agregaron 15 g L^{-1} de agar bacteriológico (bacteriological agar for molecular Biology, Sigma-Aldrich), finalmente el medio fue aforado a 200 mL con H_2O y se colocó en un matraz Erlenmeyer de 250 mL. Posterior a esto se procedió a esterilizarlo en una autoclave a 1.2 kg cm^{-2} por 15 min. A continuación el medio fue trasladado a una campana de flujo laminar y se esperó a que este tuviera una temperatura de $35 \text{ }^\circ\text{C}$ para agregarle $34 \mu\text{g mL}^{-1}$ cloranfenicol (**Nota 1**) seguido a esto, el medio fue traspasado en 10 cajas de Petri, en dichos medios se realizó la siembra de células *E. coli* (Rosetta 2 DE3) que se encontraban diluidas en medio LB líquido a 1:10, 1:100, 1:1000 y 1:10,000, estas diluciones fueron realizadas con la finalidad de obtener colonias aisladas de *E. coli* Rosetta 2 DE3 las cuales sirvieron para la preparación de células competentes.

Preparación de medio LB líquido. Se diluyó una concentración de 20 g L^{-1} de medio LB (LB Broth, Sigma-Aldrich) en 110 mL de H_2O , posteriormente se ajustó el pH a 7.5 y se aforó a 120 mL, posteriormente se tomaron 20 mL del medio preparado y se dividieron en partes iguales en 4 tubos de ensayo con tapas, los 100 mL restantes se colocaron en un matraz Erlenmeyer de 250 mL, después dichos medios fueron esterilizados en una autoclave a 1.2 kg cm^{-2} por 15 min (**Nota 1**), al finalizar la esterilización se esperó a que los 100 mL de medio se enfriaran para agregarles $34 \mu\text{g mL}^{-1}$ cloranfenicol, a los demás medios que se encontraban en tubos de ensayo no se les agregó antibiótico.

2.2.2.6 Preparación de células competentes *E. coli* Rosetta 2 (DE3)

La siembra de las diluciones de la cepa de *E. coli* Rosetta 2 (DE3) 1:10, 1:100, 1:1000 y

1:10,000, en medio LB sólido que contenía $34 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cloranfenicol, el cultivo fue incubado a 37°C durante 12 horas, posteriormente solo se guardó el cultivo o las cajas en las que se obtuvieron colonias bacterianas aisladas ya que éstas fueron destinadas para la preparación de células competentes.

Se tomó una colonia de *E. coli* Rosetta con un palillo estéril y se cultivó en 5 mL de medio con $34 \mu\text{g mL}^{-1}$, el cultivo estuvo durante 12 horas con una agitación de 200 rpm a 37°C , posteriormente se tomó un volumen de 0.2 mL del cultivo y se inoculó en 100 mL de medio LB conteniendo $34 \mu\text{g mL}^{-1}$ cloranfenicol. El nuevo cultivo fue sometido a 200 rpm a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica de 0.4 medido a una absorbancia de 550 nm, seguido de esto, se procedió a detener el crecimiento microbiano bajando la temperatura al colocar el cultivo en hielo, de esta forma se mantuvo durante 20 minutos antes de pasarlo a tubos de centrifuga de 50 mL estériles para recuperar las bacterias a 4,000 rpm durante 10 minutos a 4°C , después de desechar el sobrenadante, se resuspendió la masa bacteriana en 5 mL de CaCl_2 a una concentración final de 0.1 M (solución fría). Después de 30 minutos en hielo se recuperaron las células bacterianas a 2,500 rpm durante 15 minutos a 4°C , posterior a haber desechado el sobrenadante se resuspendieron las células bacterianas en 0.7 mL (0.1M) de CaCl_2 y 0.3 mL de glicerol a 50% (solución total de 1 mL), dichas células competentes se guardaron en alícuotas de 50 μL a -80°C .

2.2.2.7 Transformación de células competentes de *E. coli* ROSETTA 2 (DE3)

Preparación de medio LB sólido. Se tomaron 20 g de medio LB (LB Broth, SIGMA-ALDRICH) y se diluyeron en 180 mL de agua, posteriormente se ajustó el pH y se le agregaron 15 g de agar bacteriológico (bacteriological agar for molecular biology SIGMA-ALDRIC) posteriormente el medio se aforó a 200 mL y se procedió a esterilizarlo en una autoclave a 1.2 kg cm^{-2} por 15 min. Al finalizar la esterilización, el medio fue trasladado a una campana de flujo laminar y se esperó a que tuviera una temperatura de 35°C para poder agregarle $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de ampicilina y $34 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cloranfenicol, a continuación, el medio fue traspasado a 10 cajas de Petri estériles (**Nota 2**).

Se tomaron dos alícuotas de 50 μL de las células competentes descritas anteriormente, una servirá como testigo, en tanto que la otra será transformada con el plásmido petIAR3-3. Ambas alícuotas se colocaron en hielo (durante 10 minutos aproximadamente) hasta su completa descongelación, posteriormente se les agregó el plásmido en un ambiente estéril (campana de flujo laminar), excepto la muestra testigo. La muestra se mantuvo en hielo durante 15 minutos, pasado este tiempo, las bacterias fueron incubadas a 42 °C durante dos minutos para inducir la entrada del plásmido por lo que al finalizar dicho tiempo, las muestras fueron nuevamente incubadas en hielo durante 5 minutos, después de todo este proceso, a dichas alícuotas se les agregó 1 ml de medio LB (agregado en campana) sin ampicilina y se cultivó durante 60 minutos a 37 °C a 200 rpm, después de la incubación se plaquearon, con la ayuda de una aza bacteriológica, 100 μL , 50 μL , 25 μL y 12.5 μL del cultivo en cajas de Petri con medio LB sólido que contenía 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de ampicilina y 34 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de cloranfenicol, el cultivo fue incubado a 37 °C durante 12 horas.

Al finalizar el periodo de cultivo, se corroboró que el testigo no creciera, con esto se comprobó que se tenía un cultivo aséptico, mientras que el cultivo con las bacterias transformadas fueron guardadas a 4 °C (**Nota 3**) hasta su utilización para la producción de la proteína recombinante (amidohidrolasa IAR3).

2.2.2.8 Notas

Nota 1. Los cultivos sin antibióticos servirán como preinóculo para cultivar una colonia bacteriana aislada y para obtener células competentes.

Nota 2. Es importante no agregarle el antibiótico cuando el medio está muy caliente ya que se degrada y tampoco cuando está muy frío ya que no se va a solubilizar de forma homogénea además que no se podrá transferir dicho medio a las cajas de Petri.

Nota 3. Es importante que dichos cultivos estén herméticamente sellados para evitar la contaminación, además de que no se pueden guardar más de un mes porque las células ya no suelen crecer después de dicho tiempo.

2.2.3.1 Expresión del gen recombinante IAR3 de *C. canephora* en Rosetta 2(DE3) y la preparación del lisado bacteriano

2.2.3.2 Materiales

Material biológico: Cepa de *E. coli* ROSETTA 2 (DE3)

2.2.3.3 Instrumentación

Instrumentación para medio LB para pre-inoculo de *E. coli* ROSETTA 2 (DE3).

1. Vaso de precipitado de 500 mL (para preparar el medio).
2. Micropipetas de 10 μ L.
3. Probetas de 500 mL.
4. Matrices Erlenmeyer de 250 mL.
5. Potenciómetro (OHAUS).
6. Autoclave.
7. Campana de flujo laminar.
8. Palillos estériles.
9. Incubadora en agitación (Orbit Environ Shaker).

Instrumentación para producir el medio LB de inducción para *E. coli* ROSETTA 2 (DE3).

1. Vaso de precipitado de 2 L.
 2. Micropipetas de 1 mL
 3. Probetas de 2 L
 4. Matrices de 2 L
 5. Papel aluminio.
 6. Autoclave.
 7. Campana de flujo laminar
-

8. Incubadora con agitación (Orbit Environ Shaker).
9. Incubadora a 18 °C.

Materiales para la preparación de soluciones madres.

1. Vaso de precipitado de 2 litros.
2. Pipetas de vidrio de 15 mL
3. Botellas de vidrio de un litro (Kimax Kimble).
4. Balanza analítica.

Materiales para la purificación de la IAR3.

1. Sonicador.
2. Centrifuga.
3. Equipo de filtración.
4. Politrón.
5. Membranas de 45 μm .
6. Bomba de vacío.
7. Membranas de celulosa.
8. Tubos Falcon de 50 mL.
9. Vasos de precipitados.
10. Micropipetas de 1,000, 200 y 10 μL .
11. Columna de afinidad de níquel.
12. Jeringa de 5 mL.
13. Nevera con hielo.

2.2.3.4 Reactivos y amortiguadores

Medio LB para pre-inoculo: 20 g L⁻¹ de medio LB (LB Broth, SIGMA-ALDRICH), 100 μg mL⁻¹ de ampicilina y 34 μg mL⁻¹ de cloranfenicol; pH 7.5.

Medio LB para inducción: 20 g L⁻¹ de medio LB (LB Broth, Sigma-Aldrich), 100 µg mL⁻¹ de ampicilina, 34 µg mL⁻¹ de cloranfenicol, 0.5 mM de isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG), pH 7.5.

Soluciones madres

Un litro a 2 M de Tris (hidroximetil)aminometano (Tris base), pH 8.

500 mL de NaCl 4 M.

Amortiguador de lisis. Tris base 50 mM pH 8, EDTA 1 mM y PMSF 1 mM (**Nota 1**).

Amortiguador para lavar los cuerpos de inclusión. Tris base 50 mM, pH 8, EDTA 1 mM, PMSF 1 mM y desoxicolato de sodio (DOC) 2%.

Solución amortiguadora para solubilizar proteínas. Tris base 50 mM, pH 8, NaCl 300 mM, KCl 400 mM, dodecilsulfato sódico (SDS) 2%, β-mercaptoetanol 20 mM (**Nota 2**).

Amortiguador de diálisis. 100 mM de Tris, 50 mM de NaCl, 1 M de urea, 0.5 M de urea y sin urea.

2.2.3.5 Métodos

Preparación del medio para pre-inóculo y el establecimiento del primer cultivo. Se realizó la preparación de 20 g L⁻¹ de LB (LB Broth, Sigma-Aldrich) a un volumen total de 100 mL con un pH de 7.5, después de esto, dicho medio fue puesto en un matraz Erlenmeyer de 250 mL (**Nota 3**), a continuación se procedió a esterilizarlo en una autoclave a 1.2 kg cm⁻² por 15 min, al finalizar la esterilización, el medio se trasladó a una campana de flujo laminar en donde se esperó a que se enfriara para agregarle 100 µg mL⁻¹ de ampicilina y 34 µg mL⁻¹ de cloranfenicol. Posteriormente se llevaron a la misma campana los cultivos que tenían las colonias aisladas de Rosetta 2 (DE3) previamente transformadas con el plásmido petIAR3-3, con la ayuda de un palillo estéril se aisló una colonia y se sembró en los 100 mL de medio LB recién preparado, posteriormente, el cultivo fue incubado a 37 °C a 200 rpm durante 12 horas en un orbitador. De igual forma se procedió con la cepa Arctic, la diferencia fue en el tipo de antibiótico ya que en este caso se utilizaron 20 µg mL⁻¹ de gentamicina en lugar de cloranfenicol.

Preparación del medio LB para inducción y el establecimiento del segundo cultivo de rosetta 2DE3 y Arctic DE3. Al finalizar las 12 horas del cultivo anterior, se preparó 1 L de medio LB a una concentración de 20 g L⁻¹ después de ajustar el pH a 7.5, se procedió a colocarlo en dos matraces de 2 litros, posteriormente se procedió a esterilizar dicho medio a 1.2 kg cm⁻² por 15 min. Al finalizar la esterilización, el medio fue trasladado a una campana de flujo laminar y se esperó a que se enfriara, después se le agregaron 100 µg mL⁻¹ de ampicilina y 34 µg mL⁻¹ de cloranfenicol en el caso de la cepa Rosetta 2DE3 y para la cepa Arctic DE3 se le agregaron 100 µg mL⁻¹ de ampicilina y 20 µg mL⁻¹ de gentamicina. Al finalizar dicho proceso se procedió a dividir el cultivo de pre-inoculo (100 mL del cultivo anterior) en 50 mL para ser inoculados en los matraces, posteriormente, el cultivo fue incubado a 37 °C a 200 rpm hasta que se alcanzó una densidad óptica de 0.6 (**Nota 4**). A continuación, el cultivo fue incubado a 4 °C para detener el crecimiento bacteriano durante 30 minutos, al finalizar dicho tiempo, se le agregó isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) 0.5 mM en un ambiente estéril con excepción de los testigos que no fueron inducidos con IPTG, posteriormente se procedió a incubar los cultivos a 17 °C (Rosetta 2DE3) y 10 °C (Arctic DE3) a 220 rpm durante 16 horas.

Lisado bacteriano y extracción de las proteínas. Al finalizar las 16 horas de incubación el cultivo fue centrifugado a 5,000 rpm por 12 minutos, la pastilla bacteriana se resuspendió con 40 mL de amortiguador de lisis (Tris 50 mM, pH 8.0, EDTA 1 mM, PMSF 1 mM), posteriormente a la solución se le agregó lisozima 1 mg mL⁻¹ y se incubó en hielo durante 30 minutos. Después de haber transcurrido 30 minutos de incubación, las bacteria fueron lisadas por sonicación a 10 pulsos durante 30 segundos con descansos de 30s, al finalizar, el lisado bacteriano fue centrifugado a 10,000 rpm a 4° C por 30 minutos, se obtuvieron 2 fracciones: la fracción soluble y la fracción insoluble .

Fracción soluble. La fracción soluble obtenida fue pasada a través de una membrana Millipore con poros de 40 µm y posteriormente se tomó un mL como muestra representativa de los 40 mL para medir la concentración de proteína total mediante el método de Peterson, antes iniciar la purificación de la proteína IAR3.

2.2.3.6 Aislamiento de cuerpos de inclusión de la fracción insoluble.

Los cuerpos de inclusión fueron resuspendidos con el amortiguador de lisis I (Tris 50 mM pH 8.5, EDTA 1 mM, PMSF 1 mM) a esta solución se le agregó desoxicolato de sodio al 2%(DOC) y se procedió a sonicar la mezcla con los intervalos de 10 pulsos de 30 segundos (20 watts) con descansos de 30s, posteriormente, los cuerpos de inclusión se recuperaron por centrifugación a 12,000 rpm durante 20 minutos a 4 °C. A continuación la pastilla formada se lavó con agua destilada y se resuspendió en el amortiguador de solubilización (Upadhyay et al., 2014; Singh et al., 2012).

2.2.3.7 Solubilización de proteínas de cuerpos de inclusión

2.2.3.7.1 Primer protocolo para solubilizar los cuerpos de inclusión con diferentes concentraciones de SDS.

Los cuerpos de inclusión fueron suspendidos en 40 mL de amortiguador que contenía Tris 50, mM pH 8, NaCl 300 mM, β -mercaptoetanol 20 mM, dicha solución se dividió en cuatro concentraciones de SDS (0.5%, 1%, 1.5%, 2%) posteriormente se sonicó con 10 pulsos de 30s y con 30s de descanso (He y Ohnishi, 2017; Upadhyay et al., 2014).

2.2.3.7.2 Segundo protocolo para solubilizar los cuerpos de inclusión con diferentes concentraciones de urea

Los cuerpos de inclusión fueron suspendidos en 40 mL de amortiguador que contenía Tris 50, mM pH 8, NaCl 300 mM, β -mercaptoetanol 20 mM, dicha solución fue dividida en tres partes iguales a las cuales se les agregó diferentes concentraciones de urea (2 M, 4 M y 8 M), posteriormente se sonicó con 10 pulsos de 30s y con 30s de descanso.

2.2.3.7.3 Activación de la proteína soluble

Eliminación de las diferentes concentraciones de SDS. Los cuerpos de inclusión se rompen al ser tratados con SDS al 2%, por lo que la proteína es liberada de los agregados proteicos, pero no es activa ya que se encuentra parcialmente desnaturalizada, para

activar a la proteína de interés es necesario quitar el SDS agregándole KCl 400 mM, al incubar la solución durante 2 horas a 4 °C, durante ese tiempo se formó un compuesto insoluble de SDS-KCl el cual fue retirado por centrifugación a 10,400 x g. La proteína libre de SDS queda en el sobrenadante, el cual es recuperado y guardado a -20 °C hasta su próximo uso (purificación) (Upadhyay et al., 2014).

Eliminación de las diferentes concentraciones de urea. Para plegar a las proteínas solubilizadas con urea, fue necesario dializar la solución para eliminar a dicho agente caotrópico, para ello, el amortiguador de diálisis contenía Tris 100 mM, pH 8, NaCl 50 mM, así como un gradiente descendente de concentraciones de urea (urea 1 M, 0.5 M y 0 M), el proceso fue el siguiente: se preparó un litro del amortiguador ya mencionado y se le agregó la primera concentración de urea (urea 1 M), posteriormente las proteínas solubles fueron puestas en una bolsa de diálisis (dialysis tubing cellulose membrane 43 mm, Sigma-Aldrich) y dializadas durante 4 horas. Al finalizar dicho tiempo se cambió la solución de diálisis (1 L de solución de diálisis, 0.5 M de urea) y se dejó dializando durante 4 horas, después de transcurrir dicho tiempo se cambió la solución de diálisis (1 L de solución de diálisis sin urea) y se dejó 4 horas más, finalmente se realizó el último cambio de solución de diálisis (500 mL de solución de diálisis sin urea) y se dejó por 4 horas. Al finalizar dicho tiempo las proteínas solubles, sin urea, fueron guardadas en un tubo Falcon a -20 °C hasta su purificación. Todo el proceso se realiza a 4 °C.

2.2.3.6 Notas

Nota 1. El amortiguador de lisis se deberá prepara al instante de ser utilizado, no se puede guardar dicha solución para su uso posterior.

Nota 2. Preparar un litro de esta solución sin las sales de NaCl y KCl ya que estas sales precipitan al SDS. Guardar la solución a temperatura ambiente. Cuando se use el amortiguador, mezclar el amortiguador sin sales con la pastilla de cuerpos de inclusión y se le agrega el NaCl, después se realiza la sonicación y finalmente se le agrega el KCl para precipitar al SDS.

Nota 3. El matraz Erlenmeyer deberá estar tapado con papel aluminio, dicha tapa se fija con una liga para evitar que este se mueva de su lugar.

Nota 4. Con la ayuda de una micropipeta tomar 2 mL y colocarlo en una celda, este paso debe ser realizado en la campana de flujo laminar para evitar cualquier contaminación.

2.2.4.1 Cuantificación de proteína mediante el método de Peterson

2.2.4.2 Materiales

Extracto crudo, nevera con hielo, tubos de ensayo de 15 mL, tubos Falcon de 50 mL, micropipetas de 1 mL, puntas de 1 mL, espectrofotómetro, centrifuga, matraz volumétrico, vaso de precipitados y botella ámbar.

2.2.4.3 Reactivos

1. Volumen de la muestra. 10 μL de la muestra representativa de la fracción soluble, 20 μL de la fracción insoluble y 50 μL del eluato (en donde se encuentra la proteína IAR3 purificada) (**Nota 1**).
 2. Solución madre de albumina. El volumen total de la solución madre fue de 10 mL a una concentración de 1 mg mL^{-1} de albumina (guardar a 4 °C).
 3. Solución madre de desoxicolato de sodio (DOC). El volumen total de la solución de DOC fue de 30 mL a una concentración del 0.15%.
 4. Solución madre de ácido tricloroacético (TCA) ($\text{C}_2\text{HCl}_3\text{O}_2$). El volumen total de la solución de TCA fue de 100 mL a una concentración de 72%.
 5. Solución madre de cobre tartrato carbonato (CTC). 10% de NaCO_3 , 0.1% de $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y 0.2% de tartrato de sodio y potasio ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$); el volumen total de esta solución fue de 100 mL.
 6. Solución madre de dodecilsulfato de sodio (SDS). 10% de SDS; el volumen total de esta solución fue de 100 mL.
 7. Solución madre de NaOH. 0.8 N de NaOH; el volumen total de esta solución fue de 100 mL.
 8. Reactivo A). Mezcla de los reactivos CTC, NaOH, SDS y H_2O en proporción 1:1:1:1 en un volumen total 10 mL.
-

9. Reactivo B). Mezcla de un volumen de reactivo de Folin Ciocalteu en 5 volúmenes de H₂O, volumen total 10 mL.

2.2.4.3 Métodos

Para determinar la concentración de proteína total, ya sea del extracto soluble, de la parte insoluble y del eluato se sigue los mismos pasos y se utiliza las mismas concentraciones y cantidades de reactivos, ya que todos parten de una muestra representativa en la que se intuye una cantidad de 5 a 100 µg de proteína, la cual es aforada a 1 mL con H₂O.

En un tubo de ensayo de 15 mL, se agregaron 20 µL de la muestra representativa y 980 µL de H₂O. Por otro lado, en seis tubos de ensayo de 15 mL se agregaron distintas concentraciones de albumina a excepción del blanco, 0.1 µg mL⁻¹, 0.2 µg mL⁻¹, 0.4 µg mL⁻¹, 0.6 µg mL⁻¹, 0.8 µg mL⁻¹ y 1 µg mL⁻¹.

A las muestras aforadas a 1 mL, se les agregó 0.1 mL de DOC, posteriormente con la ayuda de un vortex se homogenizó la mezcla, después se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos, al finalizar dicho periodo, se incubó en hielo durante 5 minutos, al terminar el periodo de incubación se procedió a agregarle 0.1 mL de TCA, después de homogenizar la mezcla con la ayuda de un vortex, se procedió a incubarla en hielo durante 20 minutos, al concluir dicho periodo de incubación las muestras se centrifugaron a 3,000 rpm durante 15 minutos. Se descartó el sobrenadante y la pastilla fue resuspendida en el reactivo A, después, se adicionó 1 mL de H₂O a cada muestra y se procedió a agitar el tubo con la ayuda de un vortex, posteriormente la reacción fue incubada a temperatura ambiente durante 2 minutos, al finalizar el tiempo se agregaron 0.5 mL del reactivo B. La reacción se dejó incubando a temperatura ambiente durante 1 hora y finalmente se procedió a medir la absorbancia a 750 nm.

Para medir la absorbancia de las muestras, primero se midió la absorbancia del blanco que contenía todos los reactivos menos proteínas o la muestra. Posteriormente se procedió a medir la absorbancia de las soluciones con albumina de forma ascendente, después se midió nuevamente la muestra blanco y se procedió a medir la absorbancia de las muestras con las proteínas de interés, finalmente de acuerdo a la recta se procedió a realizar los cálculos necesarios para determinar la concentración proteínica ya sea en el

extracto crudo (soluble o insoluble) o en el eluato (proteína purificada en solución).

2.2.4.4 Notas

Nota 1. El volumen que se toma de la muestra depende de la concentración de proteínas, debido a que dicho dato se desconoce, en un principio se toman varios volúmenes para ver cuál se encuentra dentro del rango de medición, posteriormente solo se aparta un volumen aproximado para determinar la concentración proteica, para la solución con la IAR3, se tomaron 30 μ L.

2.2.5.1 Purificación de la proteína IAR3, mediante cromatografía de afinidad con metal inmovilizado (IMAC)

Material biológico: extracto crudo de *E. coli* Rosetta 2(DE3)

2.2.5.2 Instrumentación

Materiales para la preparación de soluciones madres. Vaso de precipitados de 2 L, botellas de vidrio de un litro (Kimax Kimble), balanza analítica capaz de medir una masa de 50 g, espátulas de metal o de plástico.

Materiales para la purificación de la IAR3: tubos Falcon de 15 y 50 mL, vaso de precipitados, micropipetas de 1000, 200 y 10 μ L, columna de afinidad de níquel (HisTrap™ FF 5 X1, Vol. 1 mL, GE Healthcare Life Sciences), jeringa de 5 mL, nevera con hielo, tubos Eppendorf de 1 y 2 mL, membranas de celulosa y pinzas de diálisis.

2.2.5.3 Reactivos y soluciones amortiguadoras

1. Soluciones madres.
 - a. 1 litro de Tris base 2 M, pH 8.
 - b. 250 mL de EDTA 500 mM (**Nota 1**).
 - c. 100 mL de NiCl_2 100 mM.
 - d. 500 mL NaCl 4 M.
 - e. 1 litro de imidazol 1 M.
-

2. Extracto crudo. 1 mg de proteína total, 1% de tritón, 20 mM de Tris base, pH 8, NaCl 500 mM, imidazol 5 mM y β -mercaptoetanol 10 mM (**Nota 2**).
3. Solución de equilibrio. Tris base 20 mM, pH 8 y NaCl 500 mM.
4. Solución de lavado I. Tritón 1%, etanol 20%, imidazol 10 mM, β -mercaptoetanol 10 mM, Tris base 20 mM y NaCl 0.5 mM.
5. Solución de lavado II. Tritón 1%, etanol 20%, imidazol 20 mM, β -mercaptoetanol 10 mM, Tris base 20 mM y NaCl 0.5 mM.
6. Solución de lavado III. Imidazol 40 mM.
7. Solución de elución I. Imidazol 100 mM.
8. Solución de elución II. Imidazol 200 mM.
9. Solución de elución III. Imidazol 250 mM.
10. Solución de elución IV. Imidazol 500 mM.
11. Solución de diálisis III. Tris base 100 mM, pH 8 y NaCl 50 mM.

2.2.5.4 Metodología

Antes de iniciar con el proceso de purificación se prepararon las distintas soluciones madres (**Nota 3**) con los respectivos volúmenes ya mencionados, también se procedió a preparar 200 mL de la solución de equilibrio, 200 mL de la solución de lavado I, 50 mL de la solución de lavado II, 50 mL de la solución de lavado III, 50 mL de la solución de elución I, 50 mL de la solución de elución II, 50 mL de la solución de elución III y 50 mL de la solución de elución IV, así como la preparación de la solución de diálisis III (**Nota 4**) y posteriormente se continuó con el proceso de purificación.

Una vez determinada la concentración de proteína total, se procedió a purificar a la IAR3 usando la cromatografía de afinidad con metal inmovilizado (IMAC), para ello se utilizó una columna de afinidad (HisTrapTM FF 5 X1, Vol. 1 mL, GE Healthcare Life Sciences).

A partir de los resultados obtenidos de la determinación de la concentración de proteína total, se procedió a tomar 0.47 mL del extracto crudo (**Nota 5**) que contenía 1 mg de proteína total y se le agregaron 4.53 mL de una solución que contenía Tris base 20 mM,

pH 8, NaCl 500 mM, β -mercaptoetanol 10 mM e imidazol 5 mM para un volumen total de 5 mL, el resto del extracto crudo fue guardado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (**Nota 6**).

Una vez preparado el extracto crudo, se procedió a equilibrar la columna de afinidad, para ello se le pasaron 5 mL de la solución madre de EDTA, 12 mL de H_2O , 5 mL de la solución madre de NiCl_2 , 12 mL de H_2O y 12 mL de la solución de equilibrio (agregarlo en dicho orden). Posteriormente, los 5 mL del extracto crudo previamente preparado (**Nota 7**) fueron pasados a través de la columna previamente equilibrada con una velocidad de flujo de 1 mL min^{-1} , posteriormente se pasaron 4 mL de la solución de lavado I, 4 mL de la solución de lavado II y 4 mL de la solución de lavado III, al finalizar los lavados se procedió a eluir las proteínas unidas inespecíficamente a la matriz cromatográfica, para ello se pasó a través de dicha columna 2 mL de la solución de elución I, 2 mL de la solución de elución II. Para eluir la proteína de interés se pasaron 2 mL de la solución de elución III, después, todos los aluatos incluyendo los lavados, fueron guardados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (**Nota 8**). Después de la purificación se realizó un análisis por electroforesis en un gel de SDS al 15%.

2.2.5.5 Notas

Nota 1. Para preparar esta solución es necesario ajustar a un pH 8 para que se disuelva y guardarla a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Nota 2. El β -mercaptoetanol 10 mM deberá ser agregado al final para evitar daños en la proteína de interés debido a la oxidación de los enlaces de disulfuro causados por el DTT.

Nota 3. Es importante tener preparadas las soluciones madres, ya que al instante no es posible prepararlos, además, todas las soluciones preparadas a partir de las soluciones madres deberán tener una temperatura de $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, para evitar la degradación de las proteínas de interés.

Nota 4. Estas soluciones deberán ser guardadas a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, en el caso de que sean preparadas momentos antes de ser utilizadas deberán ser incubadas a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 1 hora y posteriormente durante su uso deberán estar en hielo.

Nota 5. La cantidad de volumen tomado del extracto crudo para purificar es dependiente

de la concentración de proteína total presente.

Nota 6. Es importante dividir el extracto crudo en alícuotas menores para evitar estar descongelando todo el material con el que se cuenta.

Nota 7. El volumen del extracto crudo fue de 0.47 mL, sin embargo, con todos los reactivos agregados, el volumen se incrementó a 5 mL, esto se hizo para cometer menos errores a la hora de medir los volúmenes requeridos.

Nota 8. Todas las soluciones de lavado y de elución deberán tener una temperatura de 1 a 4 °C, la velocidad del flujo deberá ser 2 mL min⁻¹.

2.2.6.1 Análisis por electroforesis

Material biológico: solución de proteína total extraída de *E. coli* Rosetta 2DE3.

2.2.6.1.1 Instrumentación

Vaso de precipitados de 100 mL, probetas de 25 y 100 mL, potenciómetro, micropipetas de 10, 200 μ L y de 1 mL así como botellas ámbar de 250, equipo de electroforesis (Biorad).

2.2.6.1.2 Reactivos, soluciones amortiguadoras y condiciones de la corrida.

1. 10 μ L de N,N,N',N'-tetrametiletano-1,2-diamina.
 2. Solución de monómeros de acrilamida (30%). 29.2 g de acrilamida, 0.8 g bis-acrilamida y H₂O (**Nota 1**).
 3. Amortiguador del gel separador. Tris 1.5 M, pH 8.8 y 0.4 g SDS (**Nota 2**).
 4. Amortiguador del gel compactador. Tris base 0.5 M, pH 6.8 y 0.4 g SDS (**Nota 3**).
 5. Amortiguador de electroforesis. Tris base 0.125 M, glicina 0.96 M, 0.5% de SDS (**Nota 4**).
 6. Amortiguador de las muestras (EMLI 5X). Tris 1 M, pH 6.8, glicerol 50%, SDS 10%, 0.5 mL de β -mercaptoetanol, azul de bromofenol 1% y 0.9 mL de H₂O (**Nota 5**).
-

7. Condiciones de corrida: 100 voltios durante 2 horas (**Nota 6**).
8. Solución de tinción. Coomassie Brilliant Blue R-250 0.1%, ácido acético 10% y metanol 40% (**Nota 7**).
9. Solución para desteñir. Agua destilada, ácido acético 10% y metanol 40% (**Nota 8**).

2.2.6.2 Metodología

Se descongelaron, en hielo, los 500 μ L de EC (extracto crudo), EP (extracto procesado) así como los lavados y los eluatos, al mismo tiempo, mientras se descongelaban las muestras, se procedió a preparar el gel separador y el gel compactador en dicho orden.

Gel separador. Primero se verificó que el equipo estuviera limpio, después se preparó el gel separador al 15%, para ello se tomaron 3.75 mL de la solución de monómeros de acrilamida y se colocaron en un vaso de precipitados de 50 mL, posteriormente se tomaron 1.875 mL del amortiguador del gel separador, después se tomaron 50 μ L de PA al 10% y 10 μ L de TEMED, la mezcla fue homogenizada mediante una leve agitación manual. Posteriormente con la ayuda de una micropipeta de 1 mL se colocó en el molde de electroforesis (previamente armado) dejando 2 cm de espacio para el gel compactador, en dicho espacio se colocó agua destilada para evitar el contacto del gel separador con el aire durante la polimerización (**Nota 9**), después de 20 minutos entre el gel separador y el agua se pudo observar una pequeña raya lo que es un indicativo de que la polimerización de dicho gel ha concluido, por lo que al observar esto se procedió a preparar el gel compactador.

Gel compactador. Para la preparación del gel compactador al 4%, se tomaron 0.650 mL de la solución de monómeros de acrilamida, 1.25 mL del amortiguador del gel compactador, 3.05 mL de H₂O, 25 μ L de PA y 5 μ L de TEMED. Posteriormente se procedió a quitar el agua que se encontraba en la parte superior del gel separador y en su lugar se agregó el gel compactador recién preparado (**Nota 10**), posteriormente se procedió a ponerle un molde (forma de peine) capaz de formar 10 pocitos en los que se colocarán las muestras, después se esperó a que dicho gel polimerizara para quitar el molde y poder cargar las muestras.

Preparación y colocación de las muestras. Una vez descongeladas las muestras se procedió a prepararlas, para ello, se tomaron 24 μL de cada muestra y se procedió a colocarlos en tubos Eppendorf de 1.5 mL, posteriormente se les agregaron 6 μL de amortiguador de las muestras (EMLI 5X) (**Nota 11**); por otra parte se procedió a preparar el marcador molecular (Bio-Rad, Prestained SDS-PAGE Standards, broad range), para ello se tomaron 2 μL del marcador y se colocaron en un tubo Eppendorf de 1.5 mL, después se le adicionaron 22 μL de H_2O y finalmente se le agregaron 6 μL de EMLI 5X. Posteriormente se procedió a desnaturalizar a las proteínas de las muestras previamente preparadas a 95 °C con la ayuda de una placa de calentamiento (Multi-Block Heater), finalmente, con la ayuda de una microcentrifuga se realizó una centrifugación rápida de 30 segundos y se procedió a cargar las muestras en los respectivos pocitos formados por el molde (**Nota 12**) para ello, el equipo de electroforesis fue previamente ensamblado y se le colocó el amortiguador de electroforesis, después se realizó la corrida a 100 V durante 2 horas.

Visualización de las muestras. Para poder observar a las proteínas, se realizó la tinción del gel con la solución para tinción de geles que contenía como reactivo principal al Coomassie Brilliant Blue R-250, la tinción fue realizada durante 30 minutos, posteriormente el gel fue desteñido con la solución para desteñir durante 8 horas y se visualizó la pureza de la proteína purificada.

2.2.7.3 Notas

Nota 1. Disolver la acrilamida y la bis-acrilamida en 80 mL de H_2O , posteriormente aforar a 100 mL con H_2O , al finalizar filtrar y guardar en botella ámbar de vidrio en a 4 °C.

Nota 2. Disolver 18.17 g de Tris base en 60 mL de H_2O , ajustar el pH, adicionar 0.4 g de SDS y aforara la solución a 100 mL con H_2O y guardar la solución a 4 °C.

Nota 3. Disolver 6.05 g de Tris base en 60 mL de H_2O , ajustar el pH y adicionar 0.4 g de SDS y aforara la solución a 100 mL con H_2O y guardar la solución a 4 °C.

Nota 4. Para preparar esta solución disolver los reactivos en 300 mL de H_2O y aforar a 500 mL.

Nota 5. Pesar la cantidad correspondiente de Tris para 1 M, ajustar el pH a 6.8 para 10 mL y disolverlo en 0.6 mL, tomar un volumen de 5 mL de glicerol para tener una concentración del 50% ya que el volumen final debe ser de 10 mL, pesar la cantidad correspondiente de 10% de SDS para 10 mL y disolverlo en 2 mL, tomar 0.5 mL de β -mercaptoetanol, tomar 1 mL de azul de bromo fenol para que esté al 1% y finalmente aforar con 0.9 mL de H₂O, posteriormente dividir los 10 mL en 5 tubos Eppendorf de 2 mL y guardarlos a -20 °C.

Nota 6. El tiempo de la corrida no está bien definido ya que las concentraciones de sales pueden retardar dicho proceso, pero aproximadamente dura 2 horas; es muy importante estar al pendiente, para evitar que la muestra se salga de gel.

Nota 7. Para preparar este reactivo se tomó 1 g de Coomassie Brilliant Blue R-250 y se disolvió en 500 mL de agua, posteriormente se le agregaron 100 mL de ácido acético y 400 mL de metanol.

Nota 8. Para la preparación de esta solución se mezclaron en 500 mL de H₂O con 100 mL de ácido acético y 400 mL de metanol.

Nota 9. Al momento de agregarle el agua destilada es muy importante no perforar el gel con la corriente, por lo que la velocidad de flujo debe ser baja al momento de impactar contra el gel de acrilamida.

Nota 10. Es muy importante quitar el agua completamente para evitar cambios en la concentración del gel compactador, para ello se puede utilizar papel absorbente y sin tocar el gel separador secar la superficie, posteriormente agregar el gel compactador e inmediatamente colocar el molde para formar los pozos, cuidando que no quede burbuja alguna.

Nota 11. Es bastante obvio que cada muestra va en un tubo por separado, así como el cuidado de la temperatura a la que las muestras están siendo expuestas, esta, no debería ser mayor a 5 °C, por otra parte, el reactivo EMLI 5X deberá ser agregado en campana de extracción ya que es un reactivo cancerígeno.

Nota 12. Para cargar las muestras se puede utilizar puntas de punta fina de 200 μ L o se puede ocupar una jeringa de HPLC solo que en este caso se tiene que enjuagar la jeringa

con H₂O varias veces.

2.2.7.1 Caracterización bioquímica de la capacidad catalítica de la proteína IAR3

2.2.7.2 Materiales

Material biológico. Amidohidrolasa IAR3.

2.2.7.3 Instrumentación

Pipetas de 1 mL, 200 µL y 20 µL con sus respectivas puntas, tubos Falcon para soluciones madres, probetas de 100 y 10 mL, tubos de ensayo de 5 mL, vaso de precipitados, incubadoras, celdas, espectrofotómetro, matraz volumétrico de 25 mL, HPLC, tubos Eppendorf de 1.5 mL, refrigerador de 4 °C y congelador de -20 °C.

2.2.7.4 Reactivos

1. Solución de la reacción (primera parte). 100 µL del volumen total de la reacción, 10 µg de proteína IAR3, N-3-indolilacetil-L-alanina 1 mM, Tris 100 mM, pH 7.5, MnCl₂ 200 µM (cofactor), C₄H₁₀O₂S₂ 1 mM (DTT).
 2. Soluciones testigos.
 - a. 100 µL del volumen total de la reacción, 100 mM Tris, pH 7.5, 200 µM MnCl₂ (cofactor), C₄H₁₀O₂S₂ 1 mM (DTT).
 - b. 100 µL del volumen total de la reacción, N-3-indolilacetil-L-alanina 1 mM, 100 mM Tris, pH 7.5, MnCl₂ 200 µM (cofactor), C₄H₁₀O₂S₂ 1 mM (DTT).
 - c. 100 µL del volumen total de la reacción, 10 µg de proteína IAR3 desnaturalizada, N-3-indolilacetil-L-alanina 1 mM, Tris pH 100 mM 7.5, MnCl₂ 200 µM (cofactor), C₄H₁₀O₂S₂ 1 mM (DTT).
 3. Solución de la reacción (segunda parte). 20 µl HCl 1 M (para detener la reacción), 200 µL de acetato de etilo.
 4. Solución para el sistema de cromatografía en capa fina (TLC). 5 mL de acetato de
-

etilo, 3 mL de acetona, 1 mL de etanol y 1 mL de agua grado HPLC o tridestilada.

2.2.7.5 Métodos

2.2.7.6. Ensayos enzimáticos

Para cada ensayo enzimático las concentraciones del amortiguador, cofactor, agente reductor, sustrato y catalizador, se muestran en la sección de reactivos. Por otra parte, el tiempo de incubación de las muestras, así como de los testigos fueron de 2 horas a 36 °C, al finalizar la incubación, se procedió a realizar la extracción del sustrato y del producto obtenido con tres extracciones de 200 µL de acetato de etilo, para ello, fue necesario homogenizar la muestra con la ayuda de un Vortex durante 1 minuto, al finalizar la homogenización se procedió a separar la fracción orgánica de la acuosa, después se repitió el mismo proceso con la fase acuosa dos veces más y finalmente se desechó la fase acuosa y la fase orgánica fue secada con nitrógeno gaseoso. Al finalizar el secado de la fase acuosa se procedió a resuspender las muestras con 5 µL de acetato de etilo para TLC y 100 µL de acetato de etilo para el análisis en el HPLC.

2.2.7.7 Análisis del AIA liberado por HPLC

Para el análisis de las muestras por HPLC se inyectaron 50 µL de la muestra en el HPLC equipado con una columna de fase reversa Phenomenex Ultracarb 5 µ ODS30 50 × 4,6 mm con un flujo de 2 a 3 mL min⁻¹, de ácido acético al 1% en metanol al 20%.

2.3. RESULTADOS

2.3.1 La proteína IAR3 producida en cepas de *E. coli* (Rosseta 2DE3 y Arctic 2DE3) se encuentra en cuerpos de inclusión

Los cuerpos de inclusión son agregados proteicos que interaccionan con lípidos y polisacáridos, por lo regular suelen tener una forma ovalada o circular, la solubilidad de dichos agregados proteicos pueden ser altamente insolubles (muy comunes) o medianamente soluble (poco comunes). Es muy razonable suponer que una proteína que contiene mayoritariamente aminoácidos hidrofóbicos en su cadena polipeptídica forme

cuerpos de inclusión, sin embargo, aunque esto sea verdad, la formación de cuerpos de inclusión altamente insolubles también se debe al porcentaje de lípidos que contienen los cuerpos de inclusión y que por ende interaccionan con las proteínas aglomeradas. Para romper dichas estructuras moleculares es muy común utilizar grandes concentraciones de agentes caotrópicos como urea 8 M o cloruro de guanidina 9 M e incluso se suele sustituir dichos reactivos por altas concentraciones de detergentes. Para evitar dichos problemas se han diseñado diversos protocolos para obtener cuerpos de inclusión medianamente solubles e incluso para evitar la formación de dichos agregados proteicos, entre ellos y el más importante es la utilización de hospederos adecuados para producir proteínas recombinantes, dichos hospederos han sido diseñados para ser cultivados a temperaturas que van desde los 10 °C hasta los 17 °C armados con chaperoninas capaces de plegar las proteínas a dichas temperaturas. Por otra parte, la incorporación de plásmidos con codones raros han mejorado la producción de proteínas eucariotas producidas en bacterias, el resultado de las mejoras muchas veces no logran evitar la formación de los cuerpos de inclusión en cepas de bacterias, a pesar de ello, los cuerpos de inclusión que se forman suelen ser medianamente solubles por lo que la aplicación a concentraciones de 2 a 4 M de urea o de 1 a 2% SDS posibilitan la recuperación de las proteínas de los cuerpos de inclusión. A continuación se muestran los resultados obtenidos de la recuperación de la proteína IAR3 de los cuerpos de inclusión medianamente solubles, utilizando diferentes estrategias.

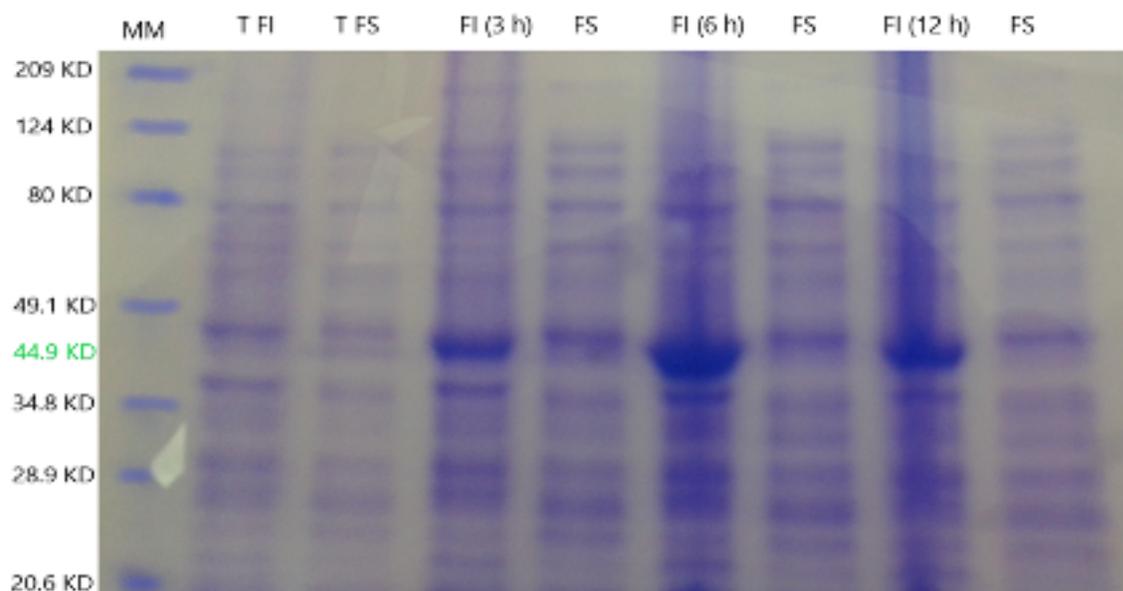


Figura 2.1. Perfil proteico de *E. coli* (Rosetta 2 DE3) durante la producción de IAR3. MM (marcador molecular), TFI (testigo fracción insoluble), TSF (testigo fracción soluble), FI (3h) (fracción insoluble a las tres horas de cultivo) y su respectiva FS (fracción soluble), FI (6h) (fracción insoluble a las seis horas de cultivo), FI (12h) (fracción insoluble a las doce horas de cultivo).

En la Fig. 2.1 se muestra la formación de los cuerpos de inclusión que contiene a la proteína IAR3 en la cepa Rosetta 2 *DE3* cultivadas en las condiciones mencionadas en la metodología. El primer carril corresponde al marcador de masa molecular, el segundo y el tercer carril corresponden al testigo el cual se caracteriza por tener las mismas condiciones de cultivo, las mismas bacterias transformadas con el plásmido que lleva el gen codificante de la IAR3, la diferencia es que dicho cultivo no fue inducido con IPTG, por ello que no se puede apreciar la proteína recombinante, por el contrario los carriles restantes que corresponden a los muestreos realizados a las 3 horas, 6 horas y 12 horas muestran una banda adicional de 49.9 kDa en la fracción insoluble, el cual corresponde a la amidohidrolasa IAR3, esto indica que el hospedero está guardando a la IAR3 en cuerpos de inclusión desde el momento que se empieza a producir dicha amidohidrolasa.

Es importante mencionar que se realizaron diversas pruebas con diferentes concentraciones de IPTG (0.1 mM a 0.5 mM) con el objetivo de evitar que se formen los cuerpos de inclusión, sin embargo, los resultados fueron muy similares a los mostrados en las Fig. 2.1 y 2.2. Esto probablemente se debe a que el promotor T7 es un promotor fuerte.

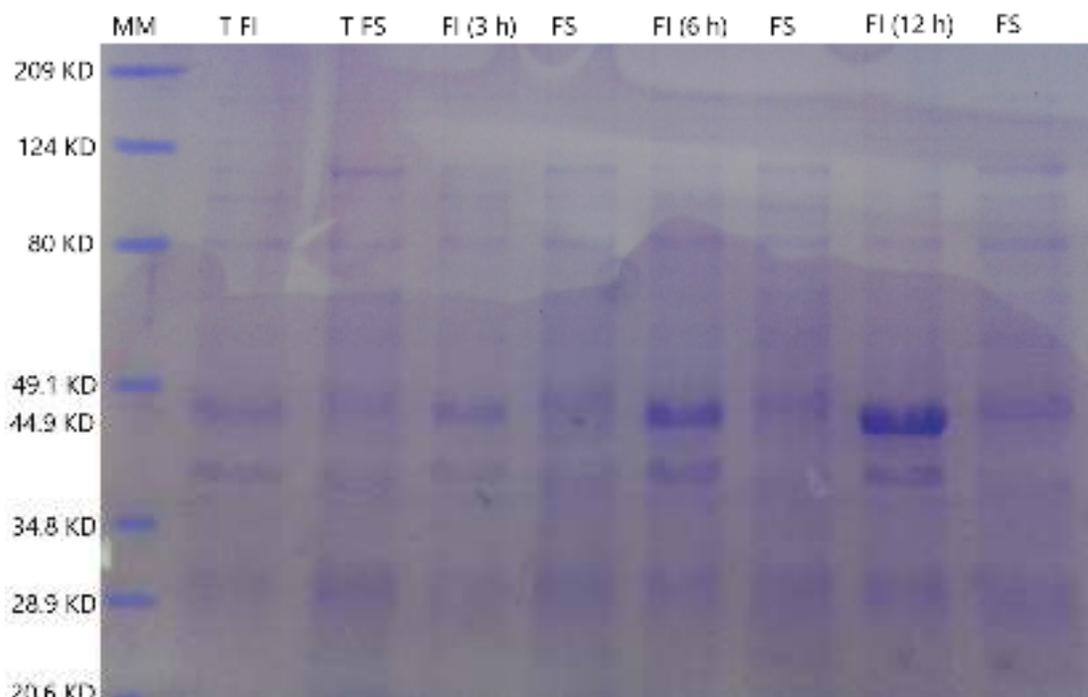


Figura 2.2. Perfil proteico de *E.coli* (Arctic DE3) durante la producción de IAR3. MM (marcador molecular), TFI (testigo fracción insoluble), TSF (testigo fracción soluble), FI(3h) (fracción insoluble a las tres horas de cultivo) y su respectiva FS (fracción soluble), FI(6h) (fracción insoluble a las seis horas de cultivo), FI(12h) (fracción insoluble a las doce horas de cultivo).

Se ha reportado que la formación de los cuerpos de inclusión se puede evitar utilizando otras cepas de bacteria capaces de plegar a las proteínas recombinantes de forma correcta a bajas temperaturas, ya que esto es uno de los múltiples motivos que provocan la formación de cuerpos de inclusión; además, cada cepa de *E. coli* diseñada para producir proteínas recombinantes tienen diversas modificaciones, como la adición de codones raros en dicha bacteria o chaperoninas capaces de plegar a las proteínas a bajas temperaturas, por lo que se procedió a utilizar la cepa Arctic DE3, ya que a diferencia de

la cepa Rosetta 2 DE3, contiene chaperoninas encargadas de plegar a las proteínas de forma correcta a 10 °C, sin embargo, los resultados que se muestran en la Fig. 2.2, fueron similares a los obtenidas anteriormente con la cepa Rosetta 2 DE3 (Fig. 2.1). Como se puede apreciar en la Fig. 2.2, el primer carril corresponde al marcador de masa molecular, el segundo y el tercer carril corresponden a las fracciones insoluble y soluble del testigo respectivamente, en dichos carriles no se puede apreciar ninguna banda proteica que tenga una masa de 44.9 KD ya que dicho cultivo no fue inducido con IPTG, por el contrario, los carriles de las fracciones insolubles de los muestreos tomados a las 3, 6 y 12 horas muestran una banda proteica que incrementa su volumen en paralelo con el tiempo de cultivo, dicha banda proteica corresponde a la proteína heteróloga de la amidohidrolasa IAR3, en cuanto a las fracciones solubles de cada muestreo no se puede apreciar ningún perfil proteico que corresponda a la proteína IAR3, estos resultados muestran que la proteína IAR3 está almacenada por el hospedero (Arctic DE3) en cuerpos de inclusión.

Para determinar si dichos cuerpos de inclusión son de los comunes, es decir, difíciles de disolver o de los poco usuales, fáciles de disolver, se procedió a establecer dos protocolos basados en el uso de urea y SDS para recuperar a la amidohidrolasa de los cuerpos de inclusión, poniendo mayor énfasis en las concentraciones de los agentes desnaturizantes para evitar dañar a las proteínas. Por lo que a menor concentración de reactivos desnaturizantes, mayor es la posibilidad de obtener a las proteínas biológicamente funcionales, dichos resultados son presentados a continuación.

2.3.2. Proteínas solubilizadas con diferentes concentraciones de SDS y urea

Es bastante normal que una proteína recombinante producida en *E. coli* forme cuerpos de inclusión, ya que el hospedero reconoce a la proteína exógena como una posible amenaza, sin embargo, al carecer de proteasas capaces de degradar *in vivo* a la proteína recombinante, el hospedero inactiva a las proteínas recombinantes mediante la formación de agregados proteicos conocidos como cuerpos de inclusión, para resolver dicho problema, los cuerpos de inclusión de la amidohidrolasa IAR3 recombinante se separaron

de las proteínas solubles por centrifugación, la cantidad de proteína soluble en la fracción soluble (FS) se muestra en el cuadro 2.1. Mientras que la fracción insoluble fue lavada con el amortiguador de Tris que contiene 2% de desoxicolato de sodio, dicha solución fue sonicada y centrifugada como se indica en la metodología, con la finalidad de separar los cuerpos de inclusión de lípidos, carbohidratos y de proteínas superficiales que interactúan con los cuerpos de inclusión, la cantidad de proteínas separadas de cuerpos de inclusión se muestra en el cuadro 2.1 en la columna 3 fila 4. En cuanto a los cuerpos de inclusión recuperados, estos fueron divididos en partes iguales para ser solubilizados con SDS (Fig. 2.3) y con urea (Fig. 2.4), la cantidad de proteína recuperada con SDS así como con urea se muestran en el cuadro 2.1. Es importante indicar que los datos presentados en el cuadro 2.1 corresponden solo a las muestras tratadas con 2% de SDS y 4 M de urea.

Cuadro 2.1. Concentraciones de proteínas totales.

Muestras	VMRA (μL)	VTSP (mL)	Abs λ (750 nm)	Concentración ($\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$)	Cantidad de proteína en mg
LisBac	20	40	0.691	9.92	396.8 mg
FS	20	40	0.338	4.74	189.6 mg
LCI.Des Na	20	40	0.251	4.3	172 mg
Ps.SDS.	50	10	0.493	2.80	28 mg
Ps.urea	50	30	0.271	1.70	51 mg

Abreviaturas. VMR (volumen de las muestras representativas analizadas), VTSP (volumen total de las soluciones proteicas), Abs (absorbancia); LisBac (Lisado bacteriano), FS (fracción soluble), LCI.DesNa (lavado de cuerpos de inclusión con 2% desoxicolato de sodio), Ps.SDS (proteína solubilizada con 2% SDS), Ps.Urea (proteína

solubilizada con 4 M de urea).

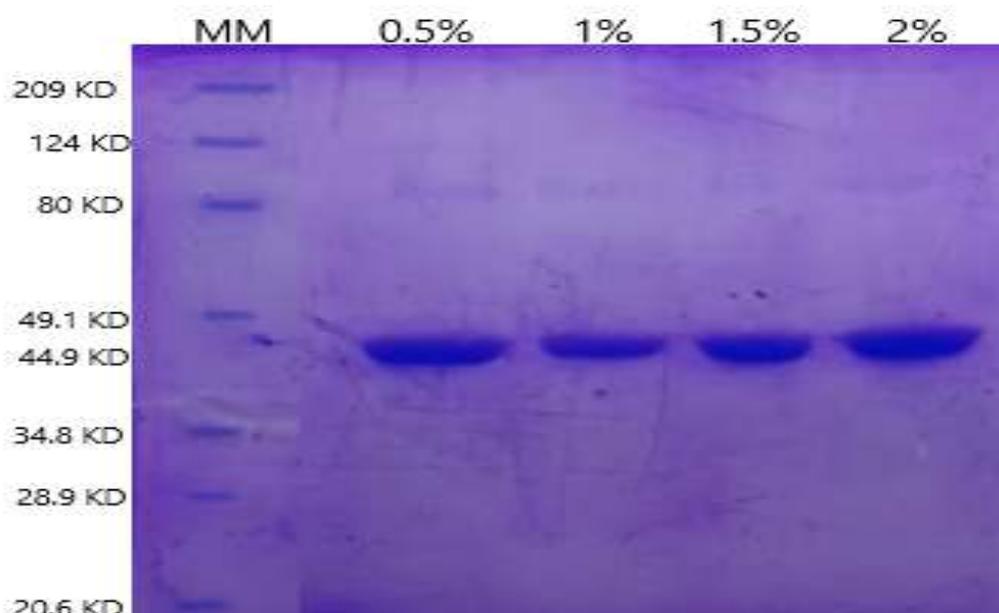


Figura 2.3. Proteínas de IAR3 recuperadas con diferentes concentraciones de SDS. MM: marcador molecular; 0.5%: de SDS en el amortiguador de 50 mM de Tris, 300 de NaCl; 1% de SDS utilizado; 1.5% porcentaje de SDS utilizado; 2% de SDS utilizado.

Después de solubilizar a las proteínas de cuerpos de inclusión con SDS se procedió a quitarle dicho detergente, tal como se describe en el protocolo, después de determinar la cantidad de proteínas recuperadas (Cuadro 2.1), se procedió a analizar dichas proteínas por electroforesis en acrilamida-SDS, para confirmar la presencia o ausencia de la proteína IAR3 del conjunto de proteínas recuperadas de cuerpos de inclusión (Fig. 2.3). El primer carril del gel de acrilamida (Fig. 2.3) corresponde al marcador de masa molecular, mientras que el resto corresponde a las diferentes concentraciones de SDS agregadas al amortiguador tal como se describe en la sección de métodos, por otro lado la proteína IAR3 puede apreciarse entre el marcador de 49.1 kDa y 34.8 kDa, siendo más específico, la proteína tiene una masa de 44.9 kDa.

Como se puede observar, los resultados fueron bastante satisfactorios, ya que la proteína IAR3 se logró recuperar en las tres concentraciones de SDS (Fig. 2.3), esta metodología

resultó tener una gran ventaja y una gran desventaja, la ventaja es que la recuperación de IAR3 resulta ser bastante buena debido a que no se liberan las demás proteínas que están en los cuerpos de inclusión, esto indica que la ruptura de los cuerpos de inclusión es parcial; la desventaja es que debido a la ruptura parcial de los cuerpos de inclusión con esta metodología, ocasiona que la mayoría de las proteínas, incluyendo la IAR3, se queden de forma insoluble atrapadas no solo en los cuerpos de inclusión sino en el compuesto insoluble SDS-KCl, el cual se forma al momento de quitar el SDS para que se lleve a cabo el proceso de replegado de la proteína.

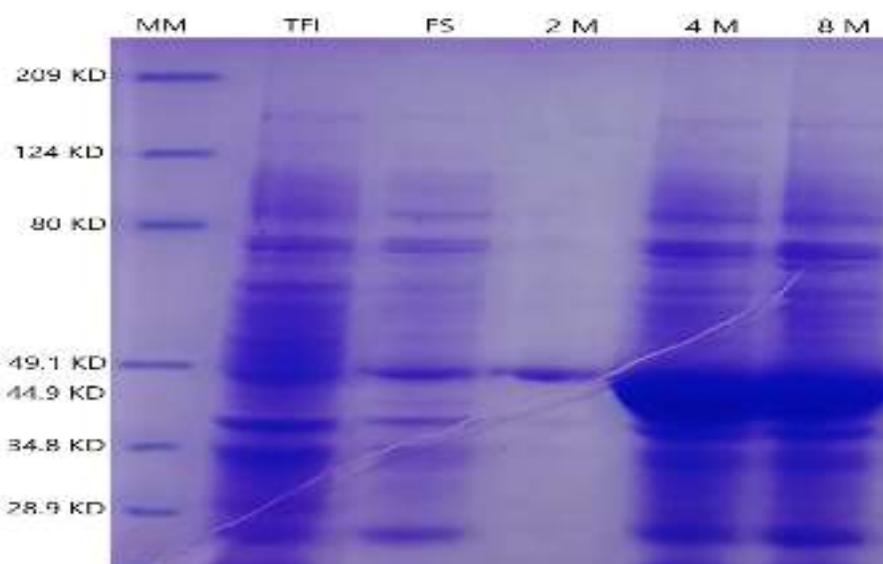


Figura 2.4. Proteínas recuperadas con diferentes concentraciones de urea. MM: marcador molecular; TFI: Testigo (fracción soluble); FS: fracción soluble; 2M concentración de urea utilizada en el amortiguador para solubilizar los cuerpos de inclusión; 4 M concentración de urea; 8 M concentración de urea.

Por otra parte, la cantidad de proteína recuperada con el proceso de solubilización con distintas concentraciones de urea se puede ver en el cuadro 2.1, mientras que la verificación de la presencia de la IAR3 se puede observar en la Fig. 2.4. El primer carril de dicha figura corresponde al marcador de masa molecular, el segundo y el tercer carril corresponden a las fracciones insoluble y soluble del testigo mientras que el cuarto carril corresponde a las proteínas recuperadas con 2 M de urea, en este carril se puede

observar una banda proteica, sin embargo, no corresponde a la masa molecular de la proteína IAR3, el quinto carril corresponde a las proteínas solubilizadas con 4 M de urea y el sexto carril corresponde a las proteínas recuperadas con 8 M de urea, en dichos carriles se puede observar diversas bandas proteicas que corresponden a las proteínas del hospedero y entre ellas se encuentra la banda proteica de IAR3 a 44.9 kD.

Estos resultados sugieren dos características importantes de los cuerpos de inclusión formados al producir a la IAR3, 1) los cuerpos de inclusión no solo se forman de proteínas exógenas (recombinante) sino también de las proteínas del hospedero, 2) estos cuerpos de inclusión son de los poco comunes ya que se puede observar que se solubilizan a 4 M de urea, ya que por lo regular, para solubilizar los cuerpos de inclusión se suele utilizar 8 M de urea y 7 M de cloruro de guanidina, por otra parte, la solubilización completa de los cuerpos de inclusión provoca que la proteína de interés esté más contaminada con proteínas del hospedero a diferencia de las proteínas de IAR3 recuperadas con SDS (Fig. 2.3).

2.3.3. Purificación de la IAR3 a partir de cuerpos de inclusión

Tal y como se ha mencionado anteriormente, para purificar a la proteína se empleó una columna de HisTrap™ FF crude, dicha columna contiene como matriz de Ni-sefarosa, está diseñada para purificar proteínas recombinantes etiquetadas con histidina mediante cromatografía de afinidad de metal inmovilizado (IMAC). Esta técnica fue utilizada por Couoh Dzul (2017) (Fig. 1.9), obteniendo resultados similares a la Fig. 2.5. Por otra parte, las proteínas recuperadas de los cuerpos de inclusión fueron pasadas a través de la columna cromatográfica previamente mencionada (Fig. 2.5), el primer carril (MM) consiste en el marcador de masa molecular, el segundo carril se encuentra vacío, en el tercer carril (EP) se puede observar el extracto procesado llamado de esta forma debido a fue pasado a través de la columna, en dicho carril se puede apreciar las proteínas que no fueron capaces de pegarse a la matriz cromatográfica así como la proteína IAR3, el hecho de que la proteína etiquetada con histidina no se haya inmovilizado en la matriz, se debe a que la columna se saturó ya que la cantidad de proteína de interés superó a la capacidad de retención de la columna cromatográfica. Para evitar este problema fue necesario determinar la cantidad de proteína total para posteriormente pasar la cantidad de proteína

necesaria; el cuarto carril (L1) consistió en el primer lavado o lavado 1, esta solución contenía 0.005 M de imidazol, 0.1 M NaCl, 0.02 M de TRIS base pH 8, el volumen de dicha solución fue de 30 mL (Cough Dzul, 2017), en este carril se puede observar la elución de aquellas proteínas que no lograron pegarse a la matriz y aquellas pegadas por de forma inespecífica, sin embargo, también se puede observar a la proteína de interés eludida junto con las demás, el cuarto carril (L2) consistió en la solución de lavado 2 con un volumen total de 20 mL, dicha solución contenía los mismos reactivos y las mismas concentraciones que el lavado 1 (L1) a excepción del imidazol ya que en esta solución fue de 0.02 M de imidazol.

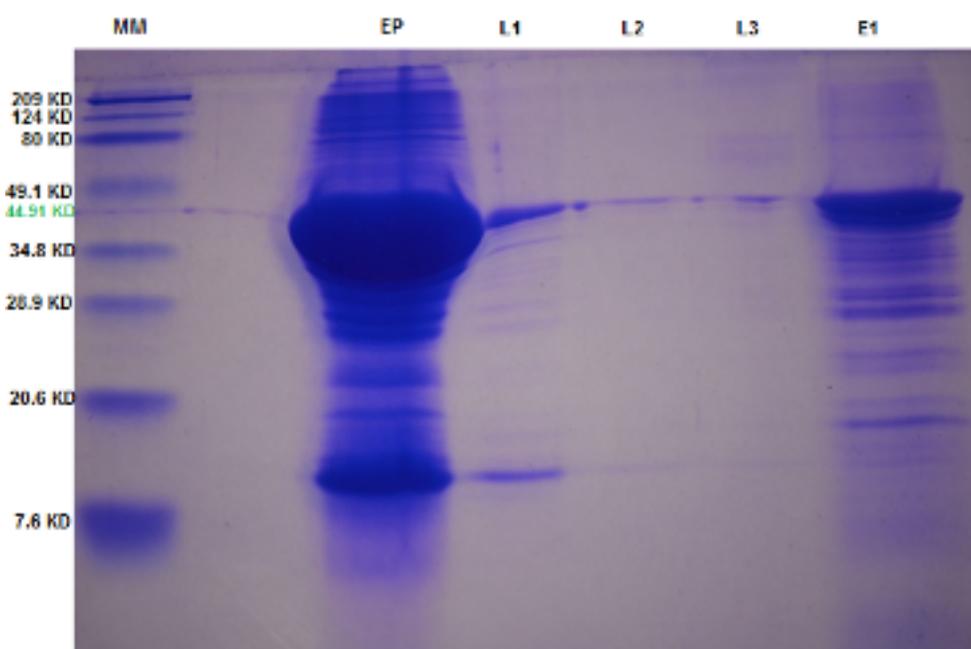
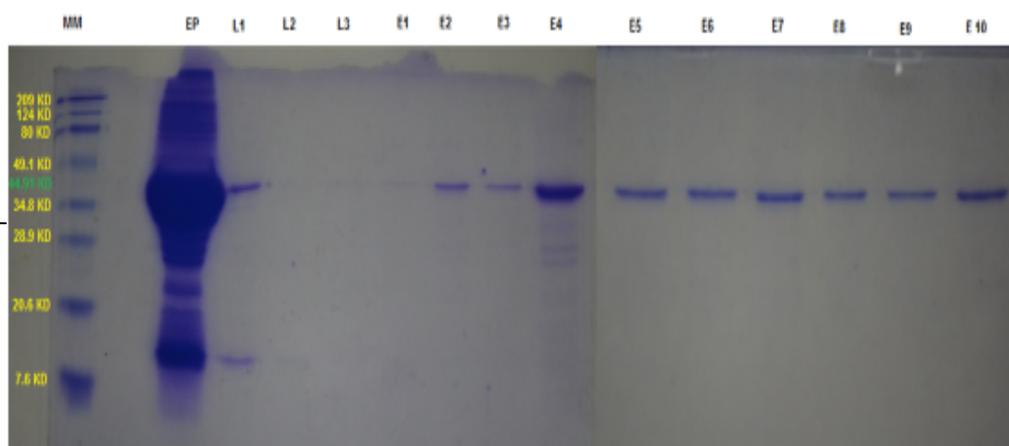


Figura 2.5. Purificación de la IAR3 a partir de la fracción insoluble. MM: marcador de masa molecular; EP: extracto procesado; L1: lavado 1 (5 mM de imidazol); L2: lavado 2 (20 mM de imidazol); L3: lavado 3 (40 mM de imidazol); E1: eluato 1 (500 mM de imidazol).

El resultado que sugiere el análisis electroforético es que las proteínas unidas débilmente



a la columna ya han sido eluidas, a excepción de aquellas que son eluidas a la concentración de imidazol de esta solución, el sexto carril (L3) al igual que las anteriores solo tuvo como variante la concentración de imidazol que fue de 0.4 M, el resultado fue muy similar al lavado 2 (L2), finalmente la proteína de interés fue eluida con 0.5 M de imidazol, el resultado que se puede observar es que la proteína no se logró purificar, ya que hubieron otras proteínas que se pegaron a la matriz de forma inespecífica, o porque algunas de las proteínas que no son de interés pudieran haber tenido colas de histidinas o porque algunas proteínas pudieran estar interactuando con puentes disulfuro con la proteína de interés. Por otra parte, la fracción soluble no fue pasada a través de la columna ya que se demostró que en dicha fracción la IAR3 no estaba presente (Fig. 2.1 y 2.2).

Figura 2.6. Purificación de la IAR3 mediante un gradiente de imidazol. MM: marcador de masa molecular; EP: extracto procesado; L1: lavado 1 (5 mM de imidazol); L2: lavado 2 (20 mM de imidazol); L3: lavado 3 (40 mM de imidazol); E1: eluato 1 (0.1 M de imidazol); E2: eluato 2 (0.15 M de imidazol); E3: eluato 3 (0.2 M de imidazol); E4: eluato 4 (0.25 M de imidazol); E5: eluato 5 (0.3 M de imidazol); E6: eluato 6 (0.35 M de imidazol); E8: eluato 8 (0.4 M de imidazol); E9: eluato 9 (0.45 M de imidazol); E10: eluato 10 (500 mM de imidazol); las masas moleculares marcadas en amarillo pertenecen al marcador molecular mientras el número en verde pertenece a la masa molecular de la proteína IAR3.

2.3.4. Purificación de la IAR3 solubilizada con 4 M de urea a partir de cuerpos de inclusión

Tomando en cuenta los resultados presentados en las Figs. 2.1 y 2.2, se procedió a modificar el protocolo de purificación, para ello se realizó un gradiente de imidazol por pasos (Fig. 2.6), ya que se pensó que se podría obtener la proteína pura mediante dicho procedimiento, la solución del gradiente de imidazol consistió en 0.1 M de NaCl y 0.02 M de TRIS base pH 8 para todas las soluciones, en cuanto a las concentraciones de imidazol fueron de 0.005 M para EP (extracto procesado), 0.005 M para el L1 (lavado 1), 0.02 M para el L2 (lavado 2), 0.04 M para el L3 (lavado 3) 0.1 M para el eluato 1 (E1), 0.15 M para el eluato 2 (E2), 0.2 M para el eluato 3 (E3), 0.25 M para el eluato 4 (E4), 0.3 M para el eluato 5 (E5), 0.35 M para el eluato 6 (E6), 0.4 M para el eluato 7 (E7), 0.45 M

para el eluato 8 (E8), 0.5 M para el eluato 9 (E9) y finalmente 0.55 M para el eluato 10 (E10). El volumen total del extracto crudo de la fracción soluble que se pasó a través de la columna de fue de 1 mL, las soluciones de lavado y de elución fueron de 2 mL. Tal como se pensó, la purificación de la proteína de interés mejoró considerablemente, si bien todavía has algunas bandas muy tenues de proteínas contaminantes en la E8, si es posible observar que la mayoría de las proteínas son liberadas de la matriz cromatográfica a 0.25 M de imidazol (E4; Fig. 2.6).

Si bien con este método se puede obtener la proteína bastante pura, también es cierto que se pierde una cantidad importante de proteína de interés, por lo que fue necesario modificar el método con el objetivo de hacerlo más eficiente la purificación. El siguiente paso, para comprobar que la proteína era liberada a 0.25 M de imidazol, se procedió a realizar un nuevo experimento, dichos resultados se pueden apreciar en la Fig. 2.7. Las concentraciones de NaCl y TRIS base pH 8 fueron las mismas que en los experimentos anteriores, en cuanto al volumen del extracto crudo que se utilizó fue de 0.5 mL para evitar saturar la columna y poder observar resultados más claros. Como se puede observar, el primer carril consiste en el marcador molecular previamente mencionado, el segundo carril corresponde a EP, los carriles 3, 4 y 5 corresponden a los lavados con las mismas concentraciones de imidazol mencionadas anteriormente, en cuanto al carril 6 que corresponde a E1 contenía 0.25 M de imidazol, en esta elución se puede observar claramente que la mayor cantidad de proteína de interés es liberada, sin embargo, también se liberan la mayor cantidad de proteínas contaminantes, en los carriles 7 (E3) y 8 (E4) se puede observar a la IAR3 con menor cantidad de proteínas contaminantes, aunque se ve acompañada de dos proteínas de aproximadamente 25 a 28 kD, por otro lado también podemos observar que para poder eluir completamente a la IAR3, es necesario utilizar una concentración de 0.5 M de imidazol. Por otra parte, analizando los dos resultados obtenidos, nos dimos cuenta que deberíamos encontrar una forma de obtener a la IAR3 pura a 0.25 M de imidazol y tratar de recuperar la mayor cantidad posible de dicha hidrolasa. Para ello se recurrió al uso de otros reactivos que permitieran eliminar los contaminantes a concentraciones menores a 0.25 M de imidazol, para ello se utilizó Tritón, etanol, se elevó la concentración de NaCl y se le adicionó β -mercaptoetanol.

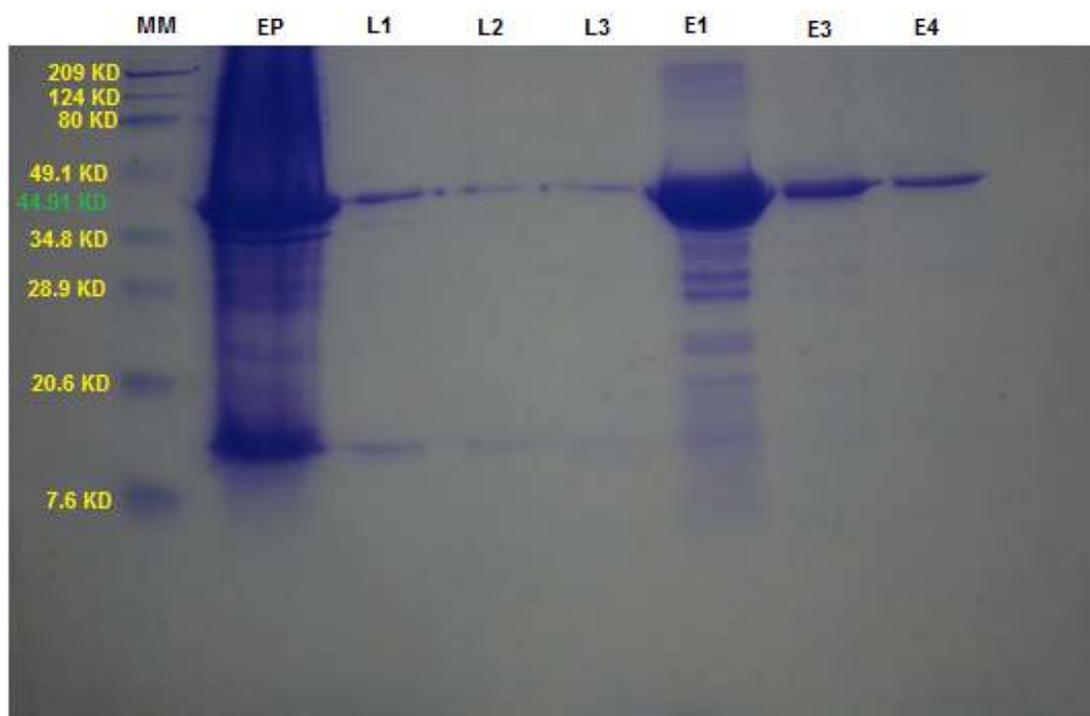
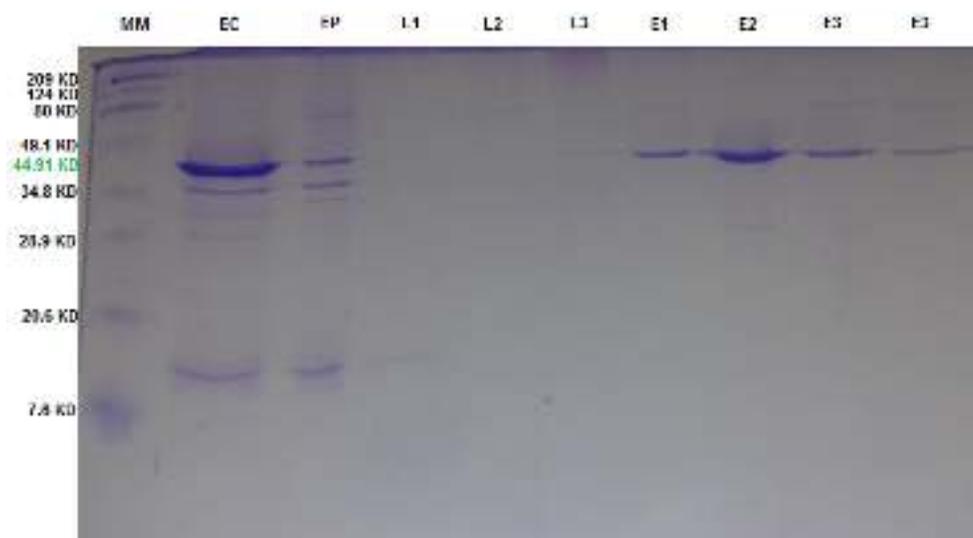


Figura 2.7. Verificación de la elusión de la IAR3 a 0.25 M de imidazol. MM: marcador de masa molecular; EP: extracto procesado; L1: lavado 1 (5 mM de imidazol); L2: lavado 2 (20 mM de imidazol); L3: lavado 3 (40 mM de imidazol); E1: eluato 1 (0.25 M de imidazol); E2: eluato 2 (0.45 M de imidazol); E3: eluato 3 (0.5 mM de imidazol); las masas moleculares marcados en amarillo pertenecen al marcador molecular mientras el número en verde pertenece a la masa molecular de la proteína IAR3.

Por otra parte, para evitar saturar a la columna así como para determinar la eficiencia de la misma, se procedió a determinar la concentración de proteína total mediante el método de Peterson, los resultados fueron de una media de 2 μg μL de proteína total, partiendo de dichos datos se procedió a pasar solo 1 mg de proteína por la columna cromatográfica. En cuanto a las modificaciones de los lavados, las concentraciones de imidazol fueron las mismas que en los lavados anteriores, mientras que las modificaciones fueron las siguientes: para el extracto crudo (EC) se le añadió 0.01 M de β -mercaptoetanol y 0.5 de NaCl, en cuanto al lavado 1 se le agregó 20% de etanol, 0.5 M de NaCl, 0.01 M de β -mercaptoetanol y 0.02 M de TRIS base pH 8.

Figura 2.8. Primeros resultados de la purificación de la proteína IAR3



usando Tritón, etanol, NaCl y β -mercaptoetanol en el lavado 1. MM: marcador de masa molecular; EC: extracto crudo, (1 mg de proteína total, 5 mM de imidazol, 0.01 M de β -mercaptoetanol y 0.5 de NaCl), EP: extracto procesado; L1: lavado 1 (5 mM de imidazol, 20% de etanol, 0.5 M de NaCl, 0.01 M de β -mercaptoetanol y 0.02 M de TRIS base PH 8); L2: lavado 2 (20 mM de imidazol); L3: lavado 3 (40 mM de imidazol); E1: eluato 1 (0.1 M de imidazol); E2: eluato 2 (0.25 M de imidazol) y los dos E3: eluato 3 (0.5 mM de imidazol); las masas moleculares marcadas en negro pertenecen al marcador molecular mientras el número en verde pertenece a la masa molecular de la proteína IAR3.

Los resultados obtenidos pueden apreciarse en la Fig. 2.8, como se puede ver en el análisis de electroforesis el primer carril (MM) muestra el marcador molecular, el segundo carril muestra al extracto crudo (EC) con una concentración de 1 mg mL^{-1} de proteína total, en el tercer carril (EP) se puede observar que en el extracto procesado se liberan la mayoría de las proteínas contaminantes aunque también se puede observar a la proteína de interés, este problema se debió a que cierta cantidad de la proteína no se logró retener en la matriz cromatográfica debido a que no se realizó una modificación en el amortiguador de calibración, en cuanto a los lavados 1, 2 y 3 mostraron un resultado similar y no se pueden apreciar las proteínas liberadas debido a que están demasiadas disueltas, en cuanto a las eluciones (E1, E2 y E3) aún hay proteínas que no son de interés, sin embargo, el grado de pureza aumentó considerablemente, también se volvió a confirmar que a 0.25 M de imidazol (E2; Fig. 2.8) se recupera la mayor cantidad de la

IAR3 y que es necesario utilizar 0.5 M de imidazol en dicho punto para recuperar la mayor cantidad de proteína de interés.

Una vez que se analizamos los datos discutidos anteriormente se procedió a modificar al experimento para ello se trató al extracto crudo EC con 10 mM de imidazol, 0.01 M de β -mercaptoetanol y 0.5 de NaCl, para el lavado 1 (L1) se le agregó 20% de etanol, 0.5 M de NaCl, 0.01 M de β -mercaptoetanol y 0.02 M de TRIS base pH 8, a lavado 2 (L2) solo se le agregó 0.02 M de TRIS base pH 8, 0.1 M de NaCl, 0.02 M de imidazol y al lavado 3 (L3) se le agregó 0.02 M de TRIS base pH 8, 0.1 M de NaCl, 0.04 M de imidazol. Los resultados obtenidos se pueden ver en la Fig. 2.9, en este análisis de electroforesis se pueden observar tres puntos importantes, 1) la calibración de la columna es de vital importancia para poder purificar a la IAR3 (EP), 2) es necesario tratar a los primeros dos lavados con 20% de etanol, 0.5 M de NaCl, 0.01 M de β -mercaptoetanol y 0.02 M de TRIS base pH 8, así como con sus correspondientes concentraciones de imidazol para poder obtener a la proteína pura, esto se comprobó con los experimentos que se realizaron después de realizar este experimento, 3) en cuanto a las eluciones E1 y E2 aún presentan una proteína contaminante de aproximadamente 70 kDa la cual desapareció cuando se realizó la experimentación del punto número 3.

Después de obtener y analizar los resultados anteriores (Fig. 2.9) se procedió a agregar a tratar al EC con 5 mM de imidazol, 10 mM de β -mercaptoetanol, 20 mM de TRIS base PH 8 y 0.5 mM de NaCl, por otra parte el L1 tenía 20% de etanol, 10 mM de imidazol, 10 mM de β -mercaptoetanol, 20 mM de TRIS base PH 8 y 0.5 mM de NaCl y el L2 tenía 20% de etanol, 20 mM de imidazol, 10 mM de β -mercaptoetanol, 20 mM de TRIS base pH 8 y 0.5 mM de NaCl, en cuanto al lavado 3 contenía 40 mM de imidazol, 20% de etanol, 0.5 M de NaCl , 0.01 M de β -mercaptoetanol y 0.02 M de TRIS base PH 8 los resultados se pueden apreciar en la Fig. 2.10.

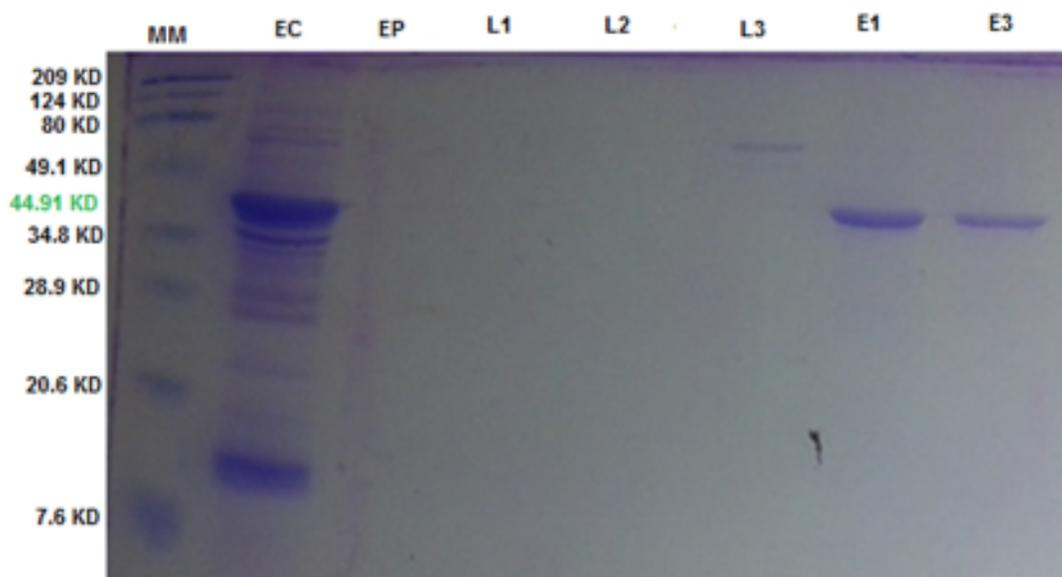


Figura 2.9. Resultados obtenidos al tratar el EC con NaCl y β -mercaptoetanol. MM: marcador de masa molecular; EC: extracto crudo, (10 mM de imidazol, 0.01 M de β -mercaptoetanol y 0.5 de NaCl), EP: extracto procesado; L1: lavado 1 (10 mM de imidazol, 20% de etanol, 0.5 M de NaCl , 0.01 M de β -mercaptoetanol y 0.02 M de TRIS base PH 8); L2: lavado 2 (20 mM de imidazol); L3: lavado 3 (40 mM de imidazol); E1: eluato 1 (0.1 M de imidazol); E2: eluato 2 (0.25 M de imidazol) y E3: eluato 3 (0.5 mM de imidazol); las masas moleculares marcados en negro pertenecen al marcador molecular mientras el número en verde pertenece a la masa molecular de la proteína IAR3.

El carril uno de la Fig. 2.10, corresponde al marcador molecular (MM), en el segundo carril se corresponde a al extracto crudo tratado con los reactivos previamente mencionados, en el tercer carril se puede observar al extracto procesado (EP), es aquí donde se puede observar algunas proteínas que no se lograron pegar a la columna, las demás no se logran observar debido a que están muy diluidas ya que 1 mg de proteína total que correspondía a 0.4 mL fue diluida en 5 mL para poder manipular a dicha solución de una forma más adecuada, también es necesario mencionar que de esta dilución se tomaron 20 μ L para ser analizados por la electroforesis, en cuanto a los lavados, en el cuarto carril se puede observar de manera tenue dos proteínas una de las cuales parece ser la IAR3. En cuanto a los dos lavados que le siguen no se observó ninguna proteína contaminante, finalmente las eluciones (E1, E2 y E3) se observan totalmente limpias, estos resultados sugieren que se ha purificado a la IAR3. Sin embargo, debido al procedimiento utilizado

para purificarla es necesario que se evalúe la capacidad catalítica de esta enzima para determinar si no perdió su capacidad enzimática. Para determinar la capacidad enzimática de la proteína se utilizará la metodología por colorimetría descrita en la metodología.

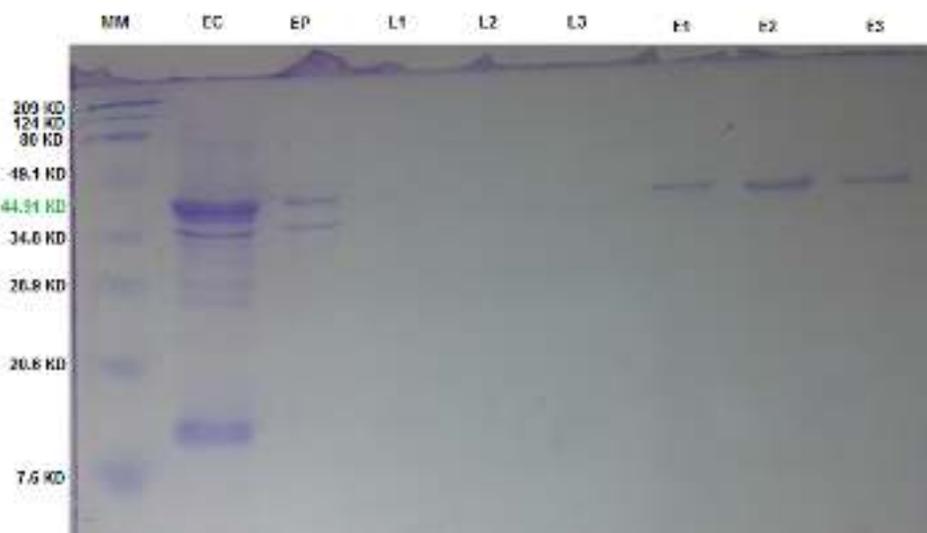


Figura 2.10. Resultados obtenidos al tratar el EC para la purificación de la proteína IAR3 usando etanol, NaCl y β -mercaptoetanol. MM: marcador de masa molecular; EC: extracto crudo (5 mM de imidazol, 10 mM de β -mercaptoetanol, 20 mM de TRIS base pH 8 y 0.5 mM de NaCl), EP: extracto procesado; L1: lavado 1 (10 mM de imidazol, 20% de etanol, 0.5 M de NaCl, 0.01 M de β -mercaptoetanol y 0.02 M de TRIS base PH 8); L2: lavado 2 (20 mM de imidazol, 1% de tritón, 20% de etanol, 0.5 M de NaCl, 0.01 M de β -mercaptoetanol y 0.02 M de TRIS base PH 8); L3: lavado 3 (40 mM de imidazol, 1% de tritón, 20% de etanol, 0.5 M de NaCl, 0.01 M de β -mercaptoetanol y 0.02 M de TRIS base PH 8); E1: eluato 1 (0.1 M de imidazol); E2: eluato 2 (0.25 M de imidazol), E3: eluato 3 (0.5 mM de imidazol); las masas moleculares marcadas en negro pertenecen al marcador molecular mientras el número en verde pertenece a la masa molecular de la proteína IAR3.

2.3.5. Purificación de la IAR3 solubilizada con 2% de SDS a partir de cuerpos de inclusión

Como ya se mencionó anteriormente cuando se describió la Fig. 2.1, una de las ventajas de purificar a las proteínas recuperadas de cuerpos de inclusión con SDS, es que dichas proteínas contienen menos contaminantes, por lo tanto, la purificación se realiza con un

gradiente de imidazol (40 mM de imidazol, 80 mM de imidazol, 100 mM de imidazol, 250 mM de imidazol y 500 mM de imidazol) (Fig. 2.11), a diferencia de la metodología empleada para purificar a la proteína IAR3 recuperada con 4 M de urea (Fig. 2.10)

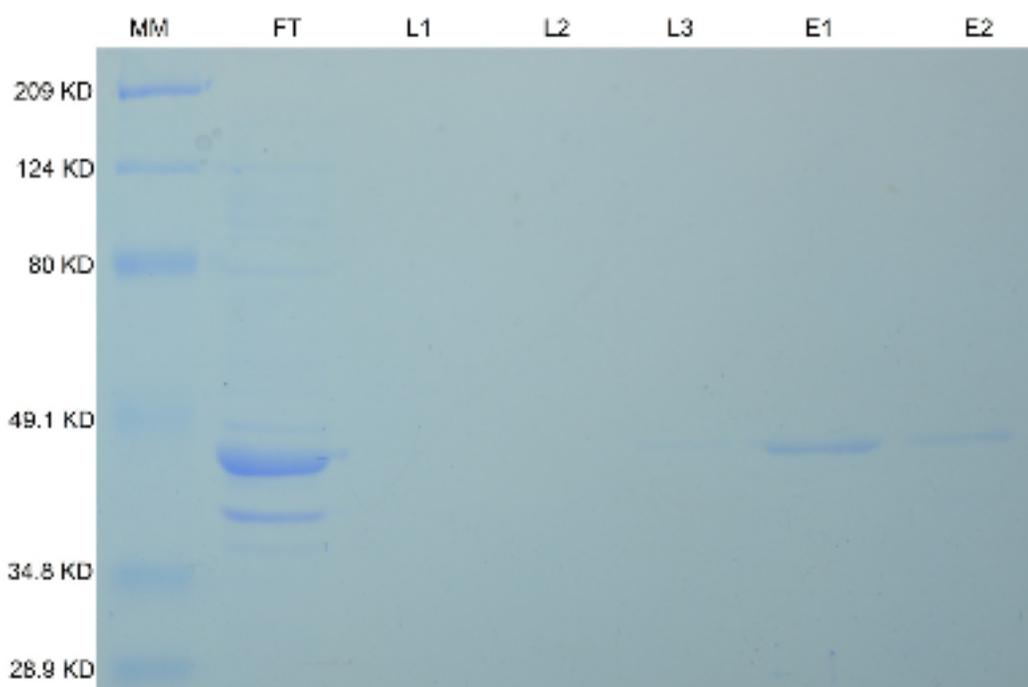


Figura 2.11. Purificación de la proteína IAR3 a partir de las proteínas recuperadas con SDS. MM: marcador molecular, FT (flow through), L1: lavado 1 (40 mM de imidazol), L2: lavado 2 (80 mM de imidazol), L3: lavado 3 (100 mM de imidazol), E1: eluato 1 (250 mM de imidazol), E2: eluato 2 (500 mM de imidazol).

En la Fig. 2.11 se muestra los resultados del proceso de purificación de la proteína IAR3. El primer carril corresponde al marcador molecular, el segundo carril corresponde al extracto crudo pasado a través de la columna (flow through), el tercer carril corresponde al lavado uno (L1) que contiene 40 mM de imidazol, el cuarto y el quinto carril corresponden a los lavados 2 y 3 (L2 y L3) respectivamente las cuales contienen 80 100 mM de imidazol, sexto y séptimo carril corresponden a los eluatos de 250 mM y 500 mM de imidazol respectivamente. El eluato de 250 mM contiene a la proteína pura, no así el de 500 mM ya que la elución a esta concentración de imidazol ocasiona la elución de una proteína de masa molecular mayor a la proteína de interés (IAR3), este resultado se

puede observar en los dos métodos empleados para la purificación, tanto como el de urea así como el de SDS, si bien la banda proteica es demasiada tenue como para ser captada por la cámara, sin embargo, se puede observar a simple vista en el gel.

Es importante mencionar que los extractos crudos o flow through pasados a través de la columna se deben almacenar y en dado caso que contengan proteínas de interés como es el caso de las Fig. 2.10 y 2.11, se pueden volver a pasar a través de la columna para terminar de purificarlos; en el caso de los lavados, solo se almacenaron los primeros tubos como muestra del proceso, los demás fueron desechados, en el caso de los eluatos, éstos fueron dializados y posteriormente concentrados y guardados a -20 °C en el amortiguador que se ocupará para realizar los ensayos enzimáticos de la IAR3.

2.3.6. Caracterización bioquímica de la IAR3

Para la caracterización de la IAR3, se procedió a utilizar una metodología establecida por Rampey et al. (2004) y LeClere et al. (2002). Debido a que la proteína fue recuperada de cuerpos de inclusión con 1, 1.5 y 2% de SDS así como con 3 y 4 M de urea, fue necesario realizar el análisis de las 5 muestras de proteínas, para discriminar aquellas que hayan perdido su actividad catalítica; por otra parte, las reacciones enzimáticas se establecieron a una temperatura de 25 °C durante 12 horas, con un amortiguador Tris pH 8; al finalizar dicho tiempo el producto, tanto como el sustrato, fueron separados de la solución acuosa de la reacción y analizados con el método de TLC, los resultados obtenidos de estos primeros experimentos, muestran que la proteína no logró hidrolizar al conjugado de AIA con alanina (Fig. 2.12). En la parte superior del primer carril de la placa cromatográfica se puede observar una mancha morada con un factor de retención (RF) de 0.85 el cual corresponde al AIA, con un recorrido de 6.8 cm, con respecto a la travesía del eluyente que fue de 8 cm, dicho color se debe a la unión del reactivo Salkowski al anillo indol del AIA, por otra parte, debido a que el AIA se encuentra libre, su trayecto en la placa es casi el doble del AIA-conjugado con alanina, por lo que al compararlo, el conjugado se muestra a la mitad de la placa cromatográfica con un RF de 0.475 y por ende con una mayor retención, con una distancia de desplazamiento de 3.8 cm con respecto a la distancia recorrida del eluyente que fue de 8 cm. Era de esperar que si la proteína lograba liberar el AIA del conjugado, el producto tendría un RF de 0.85, sin embargo, como se puede

apreciar en dicha figura, no fue posible observar la liberación del AIA, es por ello que se procedió a modificar las condiciones de la reacción. Para ello se aumentó la temperatura a 37 °C, con la finalidad de incrementar la energía de activación y por ende aumentar la actividad catalítica de la IAR3.

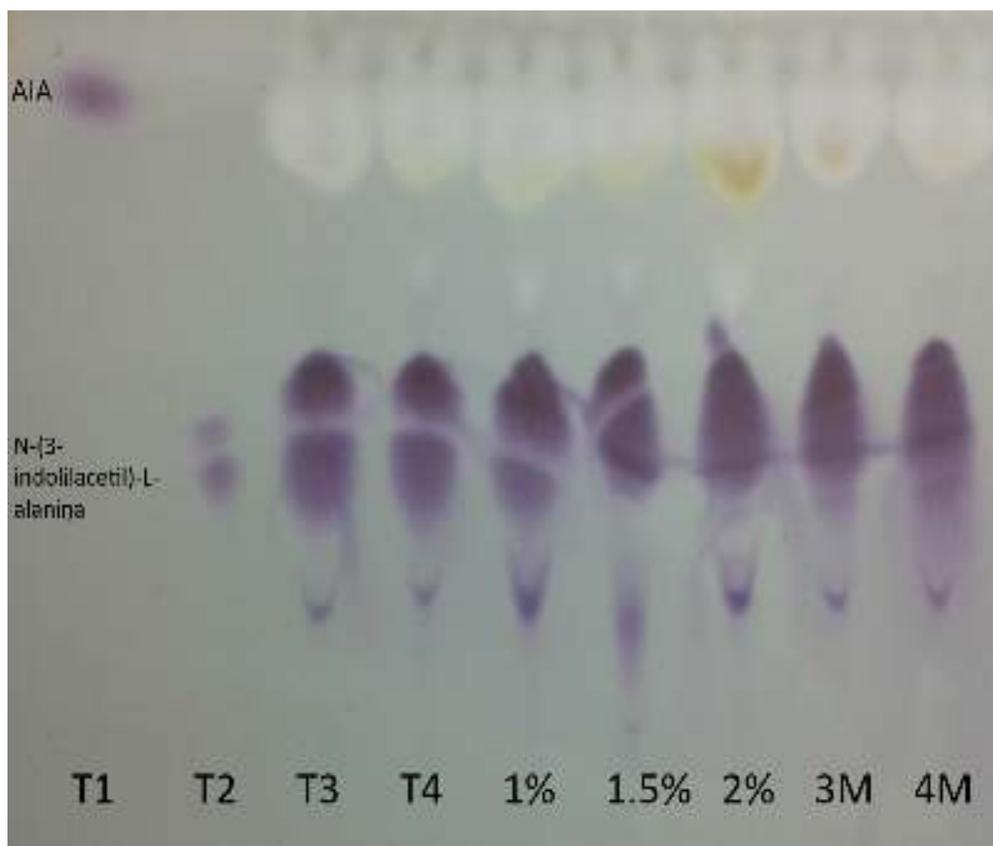


Figura 2.12. Primer análisis de la liberación del ácido indol-3 acético por cromatografía de capa fina. Testigo 1 (T1): ácido indol-3 acético solubilizado en acetato de etilo; Testigo 2 (T2): conjugado de AIA con alanina (N-3-indolilacetil-L-alanina) solubilizado en acetato de etilo; Testigo 3 (T3): extracción realizada con acetato de etilo de la solución de reacción testigo que solo contenía el sustrato (100 μ L del volumen total de la reacción, 1 mM de N-(3-Indolilacetil-L-alanina, 100 mM Tris pH 8, 200 μ M $MnCl_2$ (cofactor), 1 mM $C_4H_{10}O_2S_2$ (DTT); Testigo 4 (T4): extracción realizada de la muestra testigo que contenía la proteína desnaturalizada (100 μ L del volumen total de la reacción, 10 μ g de proteína IAR3 desnaturalizada, 1mM de N-3-Indolilacetil-L-alanina, 100 mM Tris pH 7.5, 200 μ M $MnCl_2$, 1 mM DTT; prueba de la capacidad catalítica de la proteína IAR3 que fue recuperada de cuerpos de inclusión con 1% SDS (1%): (100 μ L del volumen total de la reacción, 10 μ g de proteína IAR3, 1 mM de N-(3-Indolilacetil-L-alanina, 100 mM Tris pH 8, 200 μ M $MnCl_2$ (cofactor), 1 mM $C_4H_{10}O_2S_2$ (DTT); prueba de la capacidad catalítica de la

proteína IAR3 que fue recuperada de cuerpos de inclusión con 1.5% SDS (1.3%): (100 μ L del volumen total de la reacción, 10 μ g de proteína IAR3, 1 mM de N-3-Indolilacetil-L-alanina, 100 mM Tris pH 8, 200 μ M MnCl₂ (cofactor), 1 mM C₄H₁₀O₂S₂ (DTT); prueba de la capacidad catalítica de la proteína IAR3 que fue recuperada de cuerpos de inclusión con 2% SDS (2%): (100 μ L del volumen total de la reacción, 10 μ g de proteína IAR3, 1 mM de N-3-Indolilacetil)-L-alanina, 100 mM Tris pH 8, 200 μ M MnCl₂ (cofactor), 1 mM C₄H₁₀O₂S₂ (DTT). Prueba de la capacidad catalítica de la proteína IAR3 que fue recuperada de los cuerpos de inclusión con 3 M de urea (3M): (100 μ L del volumen total de la reacción, 10 μ g de proteína IAR3, 1 mM de N-3-Indolilacetil-L-alanina, 100 mM Tris pH 8, 200 μ M MnCl₂ (cofactor), 1 mM C₄H₁₀O₂S₂ (DTT); prueba de la capacidad catalítica de la proteína IAR3 que fue recuperada de cuerpos de inclusión con 4 M de urea (4M): (100 μ L del volumen total de la reacción, 10 μ g de proteína IAR3, 1 mM de N-3-Indolilacetil-L-alanina, 100 mM Tris pH 8, 200 μ M MnCl₂ (cofactor), 1 mM C₄H₁₀O₂S₂ (DTT); las muestras mencionadas previamente fueron incubadas en oscuridad durante 12 horas a 25 °C, a excepción de las muestras testigos 1 y 2, ya que éstas simplemente son colocadas en el TLC para tener una referencia de donde se puede encontrar en la placa el producto (AIA) y el sustrato (N-3-Indolilacetil-L-alanina).

El cambio en la temperatura a 37 °C y el tiempo de la reacción que fue de 2 horas dio mejores resultados en el primer ensayo (Fig. 2.13), ya que la muestra de la proteína recuperada con 1 % de SDS mostro liberación del AIA, es por ello que es importante describir en su totalidad este resultado; en el primer carril se puede observar el AIA con un RF de 0.85, en el segundo carril se puede ver el conjugado o del AIA con alanina o sustrato (N-3-Indolilacetil-L-alanina) con un RF 0.475, en el carril tres que corresponde al testigo tres, no se aprecia ni el conjugado ni AIA libre, ya que este testigo no contenía sustrato, producto ni proteína; la muestra testigo número 4 solo contenía el sustrato pero no la proteína mientras que el testigo 5 contenía el sustrato y la proteína desnaturalizada a base de calor, por otro lado, el carril 6 contiene la primera muestra que corresponde a la proteína IAR3 que fue recuperada con 1% de SDS, en dicho carril se puede observar la liberación del AIA, no así en los siguientes carriles que corresponden a la proteína IAR3 recuperada de cuerpos de inclusión con 1.5, 2 % de SDS, 3 y 4 M de urea en dicho orden. Para comprobar que los resultados obtenidos fueran fiables, se realizó la repetición del experimento (Fig. 2.14).

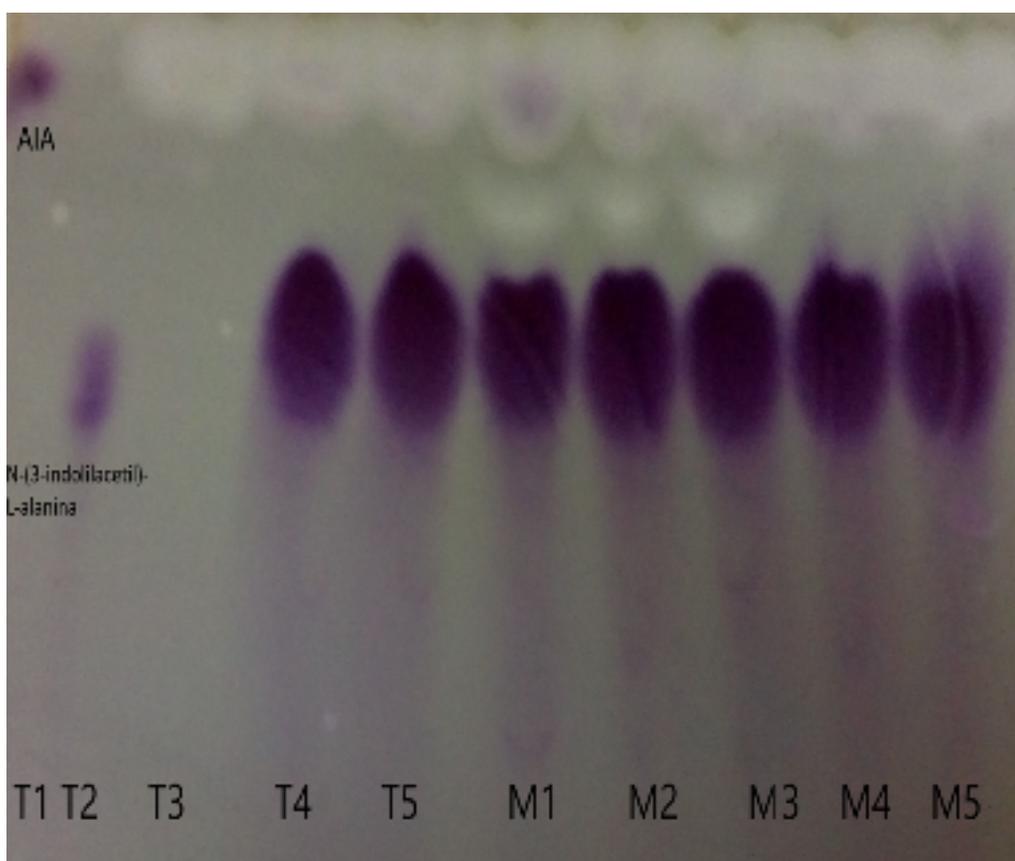


Figura 2.13. Segundo análisis de la liberación del ácido indol-3 acético por cromatografía de capa fina (TLC). Testigo 1(T1): ácido indol-3 acético solubilizado en acetato de etilo; testigo 2 (T2): conjugado de AIA con alanina (N-3-indolilacetil-L-alanina) solubilizado en acetato de etilo; testigo 3 (T3): extracción realizada con acetato de etilo de la solución de reacción que no tenía el sustrato ni la proteína IAR3 (100 μ L del volumen total de la reacción, 100 mM Tris pH 7.5, 200 μ M MnCl₂ (cofactor), 1 mM C₄H₁₀O₂S₂ (DTT)); testigo 4 (T4): extracción realizada de la muestra testigo que contenía el sustrato pero no la proteína IAR3(100 μ L del volumen total de la reacción, 1mM de N-3-Indolilacetil-L-alanina, 100 mM Tris pH 7.5, 200 μ M MnCl₂, 1 mM C₄H₁₀O₂S₂ (DTT)); testigo 5 (T5): extracción realizada de la muestra testigo que contenía la proteína IAR3 desnaturalizada y el sustrato (100 μ L del volumen total de la reacción, 10 μ g de proteína IAR3 desnaturalizada, 1 mM de N-3-indolilacetil-L-alanina, 100 mM Tris pH 7.5, 200 μ M MnCl₂, 1 mM C₄H₁₀O₂S₂ (DTT)); muestra 1 (M1): prueba de la capacidad catalítica de la proteína IAR3 que fue recuperada de cuerpos de inclusión con 1% SDS (100 μ L del volumen total de la reacción, 10 μ g de proteína IAR3, 1 mM de N-3-indolilacetil-L-alanina, 100 mM Tris pH 7.5, 200 μ M MnCl₂ (cofactor), 1 mM C₄H₁₀O₂S₂ (DTT)); muestra 2 (M2): prueba de la capacidad catalítica de la proteína IAR3 que fue recuperada de cuerpos de inclusión con 1.5% SDS (100 μ L del volumen total de la reacción, 10 μ g de proteína IAR3, 1 mM de N-3-Indolilacetil-L-alanina, 100 mM Tris pH 7.5,

200 μM MnCl_2 (cofactor), 1 mM $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_2\text{S}_2$ (DTT); muestra 3 (M3): prueba de la capacidad catalítica de la proteína IAR3 que fue recuperada de cuerpos de inclusión con 2% SDS (100 μL del volumen total de la reacción, 10 μg de proteína IAR3, 1 mM de N-3-indolilacetil-L-alanina, 100 mM Tris pH 7.5, 200 μM MnCl_2 (cofactor), 1 mM $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_2\text{S}_2$ (DTT); muestra 4 (M4): prueba de la capacidad catalítica de la proteína IAR3 que fue recuperada de cuerpos de inclusión con 3 M de urea (100 μL del volumen total de la reacción, 10 μg de proteína IAR3, 1 mM de N-3-indolilacetil-L-alanina, 100 mM Tris pH 7.5, 200 μM MnCl_2 (cofactor), 1 mM $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_2\text{S}_2$ (DTT); muestra 5 (M5): prueba de la capacidad catalítica de la proteína IAR3 que fue recuperada de cuerpos de inclusión con 4 M de urea (100 μL del volumen total de la reacción, 10 μg de proteína IAR3, 1 mM de N-3-indolilacetil-L-alanina, 100 mM Tris pH 7.5, 200 μM MnCl_2 (cofactor), 1 mM $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_2\text{S}_2$ (DTT); las muestras mencionadas previamente fueron incubadas en oscuridad durante 2 horas a 37 °C, a excepción de las muestras testigos 1 y 2, ya que estas simplemente son colocadas en el TLC como referencia del producto (AIA) y el sustrato (N-3-Indolilacetil-L-alanina) en la placa de TLC.

Para corroborar la veracidad del resultado obtenido en el experimento anteriormente mencionado, solo se utilizó la proteína que fue recuperada con 1% de SDS ya que fue la única que parecía ser capaz de liberar el AIA, para ello, se establecieron seis reacciones, de las cuales, dos corresponden a la repetición del experimento anterior y las cuatro reacciones restantes, se les incrementó la concentración de proteínas recuperadas con 1% de SDS, manteniendo la concentración de sustrato, con el objetivo de observar un incremento en la liberación del AIA, sin embargo no se pudo apreciar la liberación del AIA, en la Fig. (2.14), se pueden observar dichos resultados: los carriles de 1 al 5 corresponden a los testigos, mientras que los carriles 6 y 7 pertenecen a la repetición del experimento anterior, por lo que los resultados deberían concordar con los resultados que se muestra en la Fig. (2.13) carril 6, en cuanto a los cuatro carriles restantes aluden a las muestras que se les aumentó la cantidad de proteínas para observar un incremento en la hidrólisis del conjugado del AIA.

Después de los resultados obtenidos se realizaron tres repeticiones más y el resultado fue el mismo, por lo que antes de afirmar que las proteínas recuperadas de cuerpos de inclusión habían perdido su capacidad catalítica durante dicho proceso, se procedió a establecer un nuevo experimento y analizarlo por el HPLC ya que esta técnica nos permite identificar concentraciones a nivel nanomolar. Tal como se había determinado anteriormente con la cromatografía de TLC, la cromatografía por HPLC, confirmó la

pérdida de la capacidad catalítica de la IAR3, la Fig. 2.15 y 2.16, muestran estos resultados.



Figura 2.14. Tercer análisis catalítico de la enzima IAR3 que fue recuperada de los cuerpos de inclusión con 1% de SDS mediante la visualización de la liberación ácido indol-3 acético por TLC; prueba de diferentes concentraciones de proteínas IAR3. Testigo 1(T1): ácido indol-3 acético solubilizado en acetato de etilo; testigo 2 (T2): conjugado de AIA con alanina (N-indolilacetil-L-alanina) solubilizado en acetato de etilo; testigo 3 (T3): extracción realizada con acetato de etilo de la solución de reacción testigo que no tenía el sustrato ni la proteína IAR3 (100 μ L del volumen total de la reacción, 100 mM Tris pH 7.5, 200 μ M $MnCl_2$ (cofactor), 1 mM $C_4H_{10}O_2S_2$ (DTT)); testigo 4 (T4): extracción realizada de la muestra testigo que contenía el sustrato pero no la proteína IAR3 (100 μ L del volumen total de la reacción, 1mM de N-3-Indolilacetil-L-alanina, 100 mM Tris pH 7.5, 200 μ M $MnCl_2$, 1 mM $C_4H_{10}O_2S_2$ (DTT)); testigo 5 (T5): extracción realizada de la muestra testigo que contenía la proteína IAR3 desnaturalizada con el sustrato (100 μ L del volumen total de la reacción, 10 μ g de proteína IAR3 desnaturalizada, 1mM de N-3-Indolilacetil-L-alanina, 100 mM Tris pH 7.5, 200 μ M $MnCl_2$, 1 mM $C_4H_{10}O_2S_2$ (DTT)); muestra 1 y 2 (M1 y M2) prueba catalítica de 1 μ g de proteína IAR3: (100 μ L del volumen total de la reacción, 1 μ g de proteína IAR3, 1 mM de N-3-Indolilacetil-L-alanina,

100 mM Tris pH 7.5, 200 μ M MnCl₂ (cofactor), 1 mM C₄H₁₀O₂S₂ (DTT); Muestra 3 Y 4 (M3 y M4): prueba catalítica de 10 μ g de proteína IAR3 (100 μ L del volumen total de la reacción, 10 μ g de proteína IAR3, 1 mM de N-3-Indolilacetil-L-alanina, 100 mM Tris pH 7.5, 200 μ M MnCl₂ (cofactor), 1 mM C₄H₁₀O₂S₂ (DTT); muestra 5 y 6 (M5 y M6): prueba catalítica de 20 μ g de proteína IAR3 (100 μ L del volumen total de la reacción, 20 μ g de proteína IAR3, 1 mM de N-3-Indolilacetil-L-alanina, 100 mM Tris pH 7.5, 200 μ M MnCl₂ (cofactor), 1 mM C₄H₁₀O₂S₂ (DTT). Las muestras mencionadas previamente fueron incubadas en oscuridad durante 2 horas a 37 °C, a excepción de las muestras testigos 1 y 2, ya que estas simplemente son colocadas en el TLC como referencia del producto (AIA) y el sustrato (N-3-Indolilacetil-L-alanina) en la placa de TLC.

En la Fig. 2.15, se puede apreciar el cromatograma de la muestra testigo que corresponde a la reacción establecido con la proteína desnaturalizada y el conjugado N-(3-Indolilacetil)-L-alanina, por lo que se esperaba que la liberación del AIA fuera totalmente nula a excepción de la posibilidad que existiera autohidrólisis durante el proceso de incubación, dicho caso, podría marcar el inicio de un serio problema para determinar si la proteína mantenía su capacidad catalítica o no ya que sería imposible diferenciar entre ambas. Las condiciones de la reacción son excelentes ya que no hay auto hidrólisis, por lo que es posible determinar si la proteína IAR3 aún mantiene su capacidad catalítica, dicho resultado se puede apreciar en la Fig. 2.16.

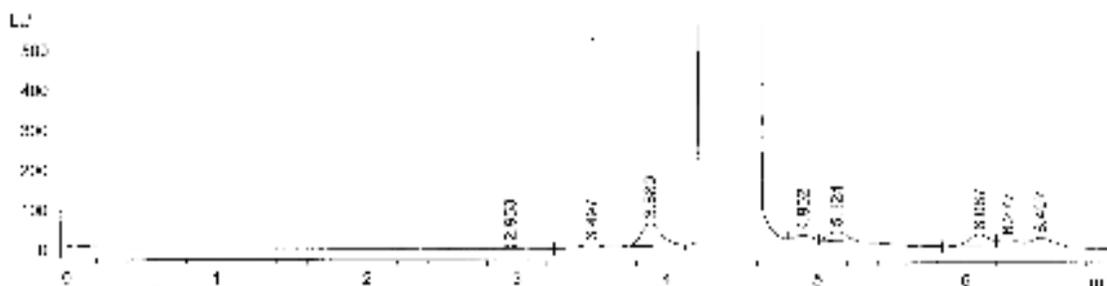


Figura 2.15. Cromatograma de la muestra testigo de la capacidad catalítica de IAR3. Volumen de inyección de muestras: 50 μ L, picos 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8 y 9: compuestos no identificados, pico 4: N-3-Indolilacetil-L-alanina. El pico del AIA debería de haber salido al minuto 5.06, por lo que debería de estar entre los picos 5 y 6.

La capacidad catalítica de la proteína recombinante IAR3 fue confirmada mediante la cromatografía por HPLC, los resultados no dejan duda alguna de que el sistema de producción y el proceso de recuperación de la proteína de cuerpos de inclusión es inadecuado (Fig. 2.16), ya que dicha enzima perdió su capacidad catalítica, resultado que

es confirmado por dos criterios importantes al comparar 1) la incapacidad de hidrólisis de la proteína desnaturalizada en la muestra testigo contra la proteína no desnaturalizada, y 2) la ausencia del pico que indica la presencia del AIA libre que debería de observarse en el minuto 5.06 en la Fig. 2.15 en caso de autohidrólisis y en el minuto 5.06 en la Fig. 2.16 del cromatograma en caso de que la proteína hubiese mantenido su capacidad catalítica.

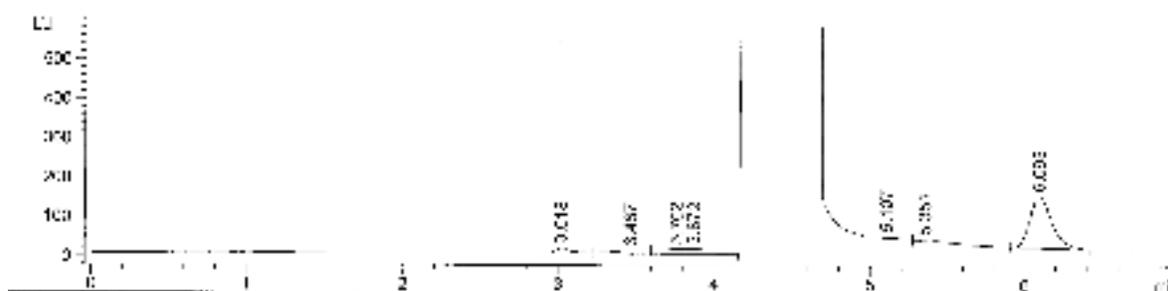


Figura 2.16. Cromatograma de la muestra testigo de la capacidad catalítica de IAR3. Volumen de inyección de muestras: 50 μ L, picos 1, 2, 3, 4, 6, 7 y 8: compuestos no identificados, pico 5: N-3-Indolilacetil-L-alanina. El pico del AIA debió de haber salido al minuto 5.06, por lo que debería de estar entre los picos 5 y 6.

Observando los cromatogramas antes mencionados, pareció importante poner énfasis en el pico que corresponde al del sustrato, ya que se muestra que dicha concentración es demasiada elevada, por lo que es posible utilizar una menor concentración para optimizar el uso del reactivo, por otro lado al minuto 5.123 de la Fig. (2.15) y al minuto 5.07 de la Fig. (2.16) se muestra un pequeño pico con un área de 10.415 que podría ser el AIA libre, sin embargo, al compararlo con el estándar del AIA y el AIA-conjugado con alanina, solo el pico que corresponde al AIA conjugado con alanina corresponde en el tiempo de retención, mientras que para el AIA libre queda muy desplazado, es por ello que se descartó la posibilidad de la autohidrólisis así como la hidrólisis realizada por la IAR3.

2.3.7. Segundo análisis de las muestras proteicas para identificar la actividad catalítica de la IAR3

Tomando en cuenta los resultados obtenidos anteriormente y el problema para identificar la actividad catalítica, se procedió a cambiar el procedimiento a seguir para caracterizar a la proteína IAR3, para ello se utilizaron las siguientes muestras: extracto de *E. coli* sin el

plásmido que contiene el gen de la proteína IAR3, proteínas solubles (fracción soluble) de *E. coli* (roseta 2 DE3) pertenecientes al cultivo del cual se obtuvo la amidohidrolasa IAR3 y la proteína IAR3 recuperada y purificada de cuerpos de inclusión (fracción insoluble).

Las muestras testigos al momento de realizar la reacción enzimática fueron tres: 1) la solución amortiguadora para realizar la reacción enzimática sin enzima, 2) la solución amortiguadora con el extracto de *E. coli* sin la proteína IAR3, 3) la solución amortiguadora con la proteína IAR3 hervida (desnaturalizada a 80 °C) y 4) la solución amortiguadora sin sustrato pero con la proteína IAR3.

Por otra parte, la proteína IAR3 fue incubada en la solución amortiguadora mencionada anteriormente a una temperatura de 30 °C durante 2 horas, la cual contenía 100 mM Tris pH 7.5 (agente amortiguador), 1 mM C₄H₁₀O₂S₂ (DTT) (agente reductor), 200 μM MnCl₂ (cofactor), AIA conjugado con alanina (sustrato), posteriormente a la incubación se realizó la extracción con acetato de etilo tal como se menciona en la metodología, después de la extracción, las muestras fueron corridas por TLC (Fig. 2.17) para separar el sustrato restante de los productos, subsecuentemente se aislaron todas las manchas separadas en la cromatografía TLC y se solubilizaron en acetato de etilo, finalmente dichas muestras separadas por TLC fueron analizadas por cromatografía de HPLC.

El análisis por HPLC de las manchas aisladas de la cromatografía de TLC, se inició con la muestra testigo, una mancha con un RF de 0.85 que se observa en la placa de sílice del TLC numerada con el número 1 de color morado (Fig. 2.17), la cual pertenece al AIA, dicho testigo sirvió para definir la posición del AIA en la placa de TLC; por otro lado, las manchas que se encuentran en los diferentes carriles enumeradas del 2 al 9 en la Fig. 2.17, pertenecen al conjugado del AIA (N-3-Indolilacetil-L-alanina) que ya hemos visto en las figuras anteriores (Fig. 2.12 - 2.16).

Como se ha descrito, los primeros dos carriles de la Fig. 2.17, pertenecen al AIA y al conjugado de AIA en el orden mencionado, mientras que el tercer carril pertenece a la proteína IAR3 desnaturalizada a 100 °C, por lo que es imposible que esta proteína libere AIA, sin embargo existe una mancha que se encuentra marcada con un signo de interrogación (?) ya que allí se encontró AIA libre (Fig. 2.18), pero debido al tratamiento previo al que se sometió la proteína IAR3, no es posible que sea liberado por la IAR3.

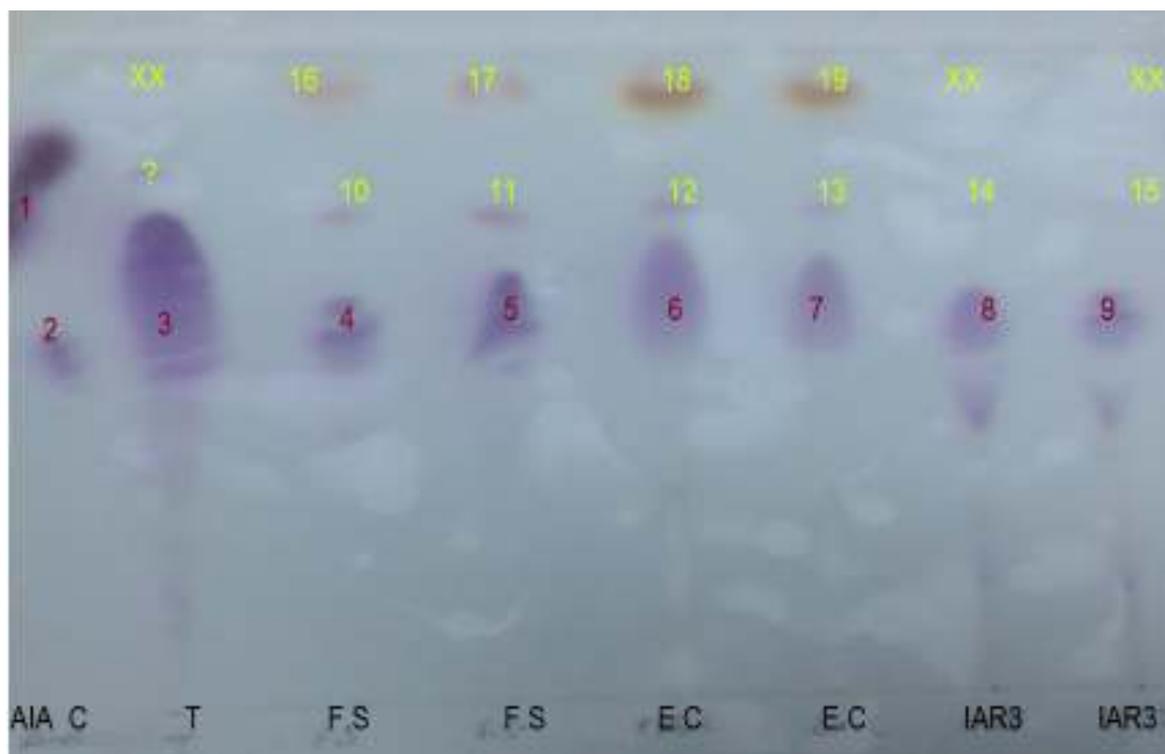


Figura 2.17. Análisis de los productos obtenidos de la reacción enzimática de IAR3 por TLC. AIA: ácido indol-3 acético, T: testigo (proteína IAR3 desnaturalizada con calor), F.S: fracción soluble (proteínas producidas por *E. coli* durante la producción de la proteína recombinante de IAR3), E.C: extracto de *E. coli* (lisado bacteriano obtenido del cultivo de *E. coli* (Rosetta 2 DE3) sin el plásmido que contiene el gen recombinante de IAR3), IAR3: carril que muestra el producto de la reacción de la proteína recombinante de IAR3; XX: ausencia de manchas, #: Números de manchas. El primer carril pertenece al AIA solubilizado en acetato de etilo, debido a la concentración del AIA que se corrió en la placa, la mancha de dicho carril supera el RF de 0.85 que normalmente pertenece al AIA, los resultados del HPLC Fig. 2.18, confirman dicho resultado, ya que se aisló la muestra a la altura de un RF de 0.85; el segundo carril marcado con la letra "C" pertenece al conjugado del AIA solubilizado con acetato de etilo, la mancha del conjugado se encuentra a un RF 0.475.

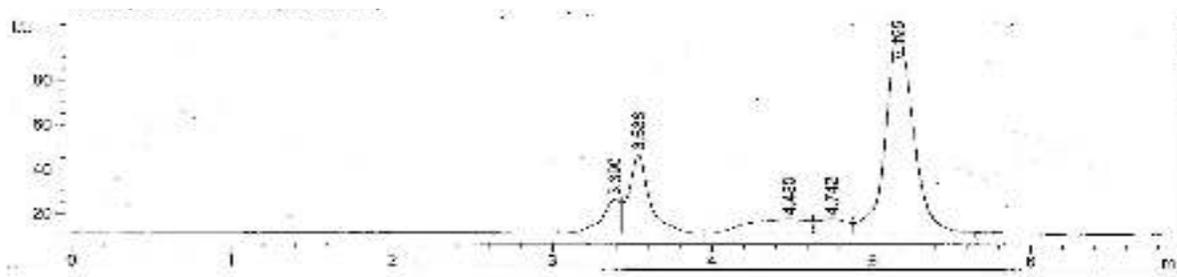


Figura 2.18. AIA libre en la muestra testigo de IAR3 desnaturalizada. Resultado del análisis por HPLC de la mancha representada con un signo de interrogación en la Fig. 2.17; los primeros tres picos son compuestos no identificados, mientras que el último pico al minuto 5.155 representa probablemente al AIA libre.

Por otro lado, el cuarto y el quinto carril de la Fig. 2.17, pertenecen a la fracción soluble, es decir, las proteínas que no estaban en cuerpos de inclusión, en este carril se pueden ver tres manchas duplicadas (6 manchas en total) marcadas con los números 4 y 5 (conjugado de AIA), 10 y 11 (a la altura donde debería estar el AIA) y 16 y 17 (mancha no identificada), los puntos marcados con los números 10 y 11 de la Fig. 2.17, fueron aislados y analizados en el HPLC (Fig. 2.19). En la placa cromatográfica de TLC pareciera que las manchas 10 y 11 son de AIA libre, por lo que se esperaba un pico al minuto 5.06 en la gráfica cromatográfica de HPLC, pero cuando fueron analizadas en el HPLC los resultados mostraron un pico pequeño al minuto 5.180 (Fig. 2.19), esto podría ser AIA, sin embargo, hay que tener cuidado ya que el AIA suele formar un pico al minuto 5.06.

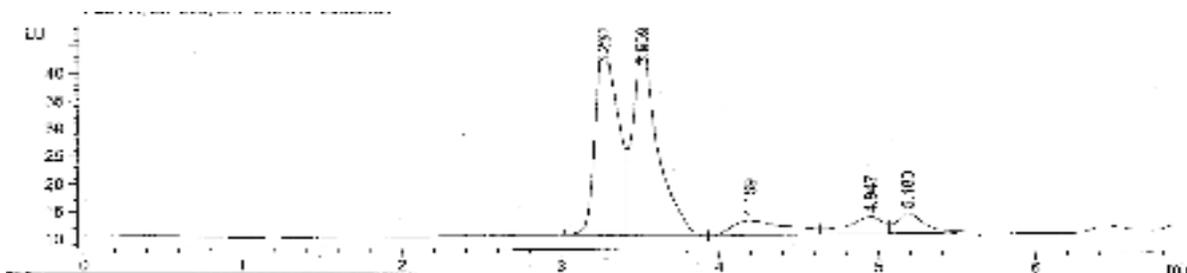


Figura 2.19. Cromatograma de la fracción soluble. Los primeros cuatro picos formados en pertenecen a compuestos no identificados, mientras que el último pico formado al minuto 5.180 podría ser AIA libre.

A la misma altura, en los carriles pertenecientes al extracto de *E. coli* (Fig. 2.17), se

observaron las mismas manchas marcadas con los números 12 y 13, dichas manchas fueron aisladas y analizadas en el HPLC, con la finalidad de ver si existe alguna proteína de *E. coli* que pudiera estar hidrolizando el conjugado de AIA (Fig. 2.20) y por ende sería notoria la presencia del AIA libre, no obstante, en la Fig. 2.20 no se logra apreciar el AIA libre.

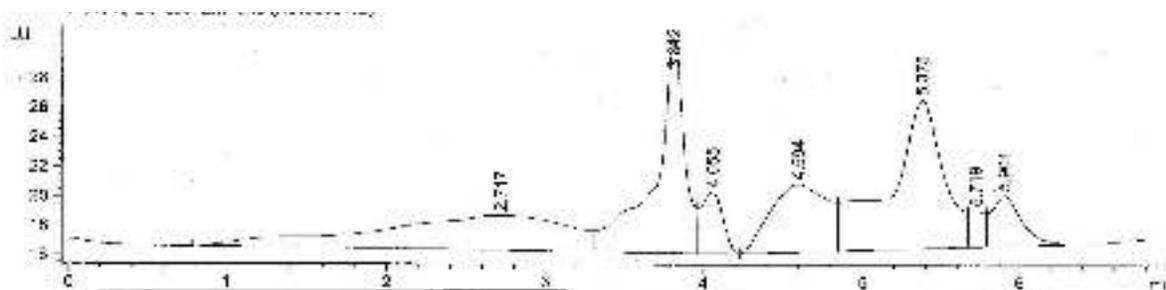


Figura 2.10. Cromatograma del extracto de *E. coli*. Ausencia del AIA libre o conjugado.

En cuanto a las manchas numeradas con los números 14 y 15, pertenecientes a los carriles de la proteína IAR3 que se aprecian de manera muy tenue en la Fig. 2.17, fueron aisladas y solubilizadas en acetato de etilo, posteriormente, se realizó su análisis por cromatografía de HPLC (Fig. 2.21). En los resultados obtenidos se esperaba encontrar AIA libre debido a que anteriormente y por medio de TLC aparecía una mancha a la altura indicada para el AIA, sin embargo, el análisis por HPLC indicó la ausencia de AIA libre. Estos resultados puntualizan la ineficacia de la proteína IAR3 que fue recuperada de los cuerpos de inclusión.



Figura 2.21. Cromatografía de las manchas 14 y 15, aisladas de la cromatografía de TLC, pertenecientes al producto obtenido del análisis catalítico de la proteína IAR3. Ausencia del AIA libre o conjugado.

2.4. DISCUSIÓN

2.4.1 RECUPERACIÓN DE LA PROTEÍNA DE CUERPOS DE INCLUSIÓN

Uno de los problemas más comunes al producir proteínas eucariotas en sistemas procariontes es el de la solubilidad, ya que la proteína se suele producir de forma insoluble (Fig. 2.1 y 2.2), esto pasa debido a que los sistemas procariontes reconocen a las proteínas como no suya, por lo que suele formar agregados proteicos, a dichos agregados proteicos se les conoce como cuerpos de inclusión.

La solución a dicho problema es bastante sencilla pero delicada, ya que la proteína puede resultar dañada durante el proceso, es por ello que se decidió cambiar el agente desnaturizante para recuperar a la proteína IAR3. En un principio la proteína IAR3 era recuperada con 8 M de urea y mediante sonicación se lograba romper y solubilizar a las proteínas de los cuerpos de inclusión, posteriormente cuando se analizó por electroforesis SDS (Fig. 2.1) se pudo observar una gran cantidad de proteína recuperada, sin embargo, una de las desventajas de esta metodología es que al desnaturizar completamente a la proteína IAR3 se daña la capacidad catalítica de la misma, otra desventaja significativa se da al momento de eliminar la urea de la solución, ya que el proceso dura 12 horas, pasando por tres gradientes de urea en concentraciones descendentes, lo que hace que la proteína IAR3 esté 12 horas con el agente desnaturizante, lo que implica un gran desafío a la proteína al momento de plegarse de la forma correcta, debido a dicho problema se decidió optar por una metodología más sencilla, práctica y que garantice que una gran parte de la proteína IAR3 recuperada sea catalíticamente funcional, para ello se empleó el SDS al 2%, esta metodología es bastante gentil con la proteína ya que el agente desnaturizante se encuentra presente en el amortiguador a bajas concentraciones, lo que favorece una semi-desnaturización de la proteína, además dicho amortiguador contiene 20 mM de β -mercaptoetanol lo que impide que la proteína pierda los puentes de disulfuro que forman las cisteínas.

En esta metodología la disolución de los cuerpos de inclusión está mediada por el agente desnaturizante (SDS) y por 10 pulsos durante 30 segundos a 20 watts con 30 segundos de descanso, por otro lado en cuanto a la parte práctica, el SDS se precipitó con 50 mM

NaCl y 400 mM KCl , estas sales formaron un compuesto insoluble SDS-NaCl o SDS-KCl por lo que fue fácil retirar dichos compuestos insolubles a 10,400 x g durante 20 minutos; posteriormente, cuando se analizó la muestra por electroforesis SDS page (Fig. 2.3 carril 2) se pudo observar que la proteína IAR3 se logró recuperar de cuerpos de inclusión.

2.4.2. Purificación de la proteína IAR3

Después de recuperar la proteína de los cuerpos de inclusión el siguiente paso fue su purificación mediante una cromatografía de afinidad, uno de los primeros pasos fue probar la metodología estándar que consiste en pasar a la proteína disuelta a través de la columna de afinidad, después lavarla con 20 y 40 mM de imidazol y finalmente eluirla con 500 mM de imidazol. El problema fue que la IAR3 es eluída con otras proteínas (Fig. 2.5) por lo que se decidió realizar un gradiente de imidazol (Fig. 2.6), la idea era que si la etiqueta que tiene IAR3 de 6 His tiene mayor afinidad entonces a cierta concentración de imidazol la proteína podría ser liberada totalmente pura, esta teoría funcionó correctamente en la práctica, sin embargo, fue necesario realizar 10 concentraciones diferentes para obtener a la proteína pura, el problema es que durante el proceso se pierde demasiada proteína de interés (IAR3), además se puede observar que la IAR3 es mayormente eluída a 250 mM de imidazol junto con la mayoría de las proteínas contaminantes (Fig. 2.6 y 2.7). Debido a este problema se decidió cambiar la metodología de purificación con la finalidad de evitar la pérdida de la proteína IAR3, para ello, se decidió mejorar los lavados, agregándole etanol al 20% para romper las interacciones hidrofóbicas entre las proteínas, también se utilizó 10 mM de β -mercaptoetanol para proteger los grupos sulfhidrilos y evitar el rompimiento de los puentes de disulfuro, además de estos reactivos, los lavados también contenían 1% de tritón e imidazol (10, 20 y 40 mM de imidazol) para eliminar cualquier proteína pegada de forma inespecífica a la matriz de sefarosa o al níquel, la Fig. 2.10, muestra que los primeros tres lavados cumplen su cometido al eliminar la mayoría de los contaminantes, finalmente la proteína es eluída a 250 mM de imidazol.

En el caso de las proteínas recuperadas con SDS la purificación fue más fácil ya que solo se utilizó un gradiente de imidazol (Fig. 2.11), esto se debe a que a 2% de SDS los cuerpos de inclusión no se solubilizan totalmente, lo que ocasiona que la liberación de

IAR3 se obtenga menos contaminada de proteínas del hospedero, sin embargo, la desventaja de este método radica en la cantidad de proteína recuperada, si comparamos las cantidades de proteínas recuperadas entre el método de urea y el de SDS, el método de urea es más eficiente ya que solubiliza totalmente a los cuerpos de inclusión aunque con ello también se liberan las proteínas del hospedero, es por eso que en las proteínas recuperada con urea son un poco más complicadas de purificar.

2.4.3. Caracterización bioquímica de la proteína IAR3.

Los resultados obtenidos tanto por TLC como por HPLC de la caracterización bioquímica de la amidohidrolasa IAR3, mostraron que la dicha enzima perdió su capacidad catalítica que consiste en hidrolizar los conjugados del AIA con alanina, debido al proceso de producción y recuperación de dicha amidohidrolasa, esto se debe probablemente a tres factores principales, 1) el sistema (*E. coli*) utilizado para producir a la IAR3, 2) el tipo de cuerpos de inclusión y 3) la sensibilidad de la proteína IAR3 a los agentes caotrópicos. Haciendo énfasis en el sistema de producción de proteínas recombinantes, es bastante comprensible, que una proteína tipo enzima producida naturalmente en células eucariotas, tenga mayor probabilidad de mantener su capacidad catalítica original si es producida heterológamente en un sistema eucariota, esto se debe a que las células eucariotas suelen tener orgánulos similares, que contiene la maquinaria enzimática que les permite producir proteínas bastante complejas, como es el caso del aparato de Golgi y el retículo endoplasmático, esto no quiere decir que no se pueda producir una proteína compleja en un sistema procariota, ya que por lo regular, la estructura primaria es posible bio-manufacturarla en las diferentes cepas de *E. coli* diseñadas para producir proteínas recombinantes, aunque para este caso, es necesario realizar un plegamiento *in vitro* para que la proteína pueda cumplir con su función biológica, por otra parte, el grado de impacto negativo en las proteínas recombinantes tipo enzimas producidas en *E. coli*, dependen del segundo y el tercer factor sin un orden aparente, ya que hay cuerpos de inclusión difíciles de solubilizar, así como la contraparte de dicha característica, esto depende de las características de las proteínas que lo conforman (hidrofóbicas e hidrofílicas), sin embargo, aunque parezca poco lógico, las mismas características de las proteínas independientemente del tipo de cuerpo de inclusión en el que se encuentren, pueden o no

recuperar su estructura terciaria y por ende su capacidad catalítica, en muchos casos las proteínas son muy sensibles a la concentración de los agentes caotrópicos o desnaturizantes, por lo que se provoca un impacto negativo en la capacidad de recuperar su estructura terciaria y su capacidad catalítica, incluso si las concentraciones de los agentes caotrópicos son menores. En el caso de la IAR3, las concentraciones de urea y SDS utilizadas bastaron para eliminar completamente la capacidad catalítica de dicha amidohidrolasa, estos resultados nos llevarían a pensar que la solución es utilizar concentraciones menores de dichos agentes caotrópicos, sin embargo, al utilizar una concentración menor la solubilización de los cuerpos de inclusión no sería posible, como ya se ha mencionado anteriormente, uno de los problemas principales en producción de la amidohidrolasa IAR3 fue la formación de los agregados proteicos, un problema menor en muchas proteínas de carácter enzimático producidas de forma recombinante, ya que se han utilizado agentes caotrópicos para solubilizar a las proteínas de los cuerpos de inclusión y con la simple retirada de los agentes desnaturizantes, las proteínas solubilizadas suelen recuperar su estructura terciaria, sin embargo, esto no siempre ocurre, ya que existen proteínas que necesitan un proceso de plegamiento *in vitro* debido a que no son capaces de recuperar su estructura terciaria original simplemente con la retirada del agente caotrópico, esto último, es muy común en la producción de proteínas recombinantes de carácter comercial y existen protocolos establecidos para manipular dicho aspecto, por lo que podría ser una opción para recuperar la capacidad catalítica de la amidohidrolasa IAR3, no obstante, por motivos de veracidad, no es posible aplicar dicha técnica, ya que el objetivo principal, es caracterizar la proteína IAR3 lo más parecida a la proteína producida en la planta para poder comprender la importancia de esta amidohidrolasa durante la ES de *C. canephora*, es por ello que la solución a dicho problema es utilizar un sistema eucariota para biosintetizar dicha amidohidrolasa.

CAPÍTULO III

EL SISTEMA PARA LA PRODUCCIÓN DE LA IAR3 RECOMBINANTES ES IMPORTANTE SI SE QUIERE REALIZAR LA CINÉTICA DE DICHA PROTEÍNA

3. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

3.1. CONCLUSIONES

La cantidad de proteína IAR3 recombinante producida en las cepas de *E. coli* diseñadas para la producción de proteínas recombinantes, en términos de rendimiento bruto, es muy buena, sin embargo, las proteínas recombinantes producidas en dicho sistema, son aglomeradas por el hospedero en agregados proteicos conocidos como cuerpos de inclusión, esto se debe a que dicha bacteria no posee los codones necesarios para sintetizar a la IAR3, por lo que ésta utiliza sus codones para compensar dicha carencia, como resultado a dicho fenómeno, la capacidad catalítica de la IAR3 es neutralizada, por ello, el protocolo que se utilizó para solubilizar a la amidohidrolasa IAR3, tenía como objetivo recuperar la capacidad catalítica de dicha enzima y aunque se logró solubilizarla, no fue posible recuperar la capacidad catalítica de la amidohidrolasa IAR3, siendo que se utilizó la menor concentración posible de agentes desnaturizantes (SDS y urea), esto demuestra que la proteína IAR3 se desnaturaliza a bajas concentraciones de SDS y urea reduciendo la capacidad de la misma para recuperar su estructura original al momento de retirar los agentes desnaturizantes, por otro lado, la purificación de la IAR3 por el método de cromatografía por afinidad, después de la solubilización, impacta negativamente al rendimiento de dicha amidohidrolasa, es por ello que es necesario establecer un protocolo para la producción de la proteína IAR3 de forma soluble, utilizando un hospedero adecuado para su producción, debido a que la metodología empleada hasta ahora, daña completamente la estructura de la IAR3 provocando la pérdida total de la capacidad catalítica de dicha enzima.

3.2. PERSPECTIVAS

Es necesario clonar el gen de la IAR3 en un vector de expresión para transformar levaduras y obtener la proteína soluble, evitando así desnaturalizarla, de esta forma será posible su caracterización bioquímica.

BIBLIOGRAFÍA

- Avilez-Montalvo, R. N. (2015). Determinación del patrón de expresión de genes que codifican para amidohidrolasas de conjugados del AIA durante la inducción de la ES en *Coffea canephora*, CICY, Mérida. 78 p.
- Ayil-Gutiérrez, B. A., R. M. Galaz-Ávalos, E. Peña-Cabrera y V. M. Loyola-Vargas (2013). Dynamics of the concentration of IAA and some of its conjugates during the induction of somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. *Plant Signaling & Behavior*, 8, e26998.
- Bai, B., Y. H. Su, J. Yuan y X. S. Zhang (2013). Induction of somatic embryos in *Arabidopsis* requires local *YUCCA* expression mediated by the down-regulation of ethylene biosynthesis. *Molecular Plant*, 6, 1247-1260.
- Bajguz, A. y A. Piotrowska (2009). Conjugates of auxin and cytokinin. *Phytochemistry*, 70, 957-969.
- Balzan, S., G. S. Johal y N. Carraro (2014). The role of auxin transporters in monocots development. *Frontiers in Plant Science*, 5, 393.
- Barbez, E., M. Kubes, J. Rolcik, C. Beziat, A. Pencik, B. Wang, M. R. Rosquete, J. Zhu, P. I. Dobrev, Y. Lee, E. Zazimalová, J. Petrášek, M. Geisler, J. Friml y J. Kleine-Vehn (2012). A novel putative auxin carrier family regulates intracellular auxin homeostasis in plants. *Nature*, 485, 119-122.
- Barbosa I. C. R., U. Z. Hammes y C. Schwechheimer, (2018). Activation and polarity control of PIN-FORMED auxin transporters by phosphorylation, *Trends in Plant Science*, 23, 523-538.
- Bartel, B. y G. R. Fink (1994). Differential regulation of an auxin-producing nitrilase gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91, 6649-6653.
- Benková, E., M. Michniewicz, M. Sauer, T. Teichmann, D. Seifertová, G. Jürgens y J. Friml (2003). Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell*, 115, 591-602.
- Bitto, E., C. A. Bingman, L. Bittova, N. L. Houston, R. S. Boston, B. G. Fox y G. N. Phillips (2009). X-ray structure of ILL2, an auxin conjugate amidohydrolase from *Arabidopsis thaliana*. *Proteins*, 74, 61-71.
- Borghi, L., J. Kang y R. de Brito Francisco (2019). Filling the gap: Functional clustering of ABC proteins for the investigation of hormonal transport *in planta*. *Frontiers in Plant Science*, 10, 422.
- Bruinsma, J. y K. Hasegawa (1990). A new theory of phototropism. Its regulation by a light-induced gradient of auxin-inhibiting substances. *Physiologia Plantarum*, 79, 700-704.
-

-
- Brumos, J., J. M. Alonso y A. N. Stepanova (2014). Genetic aspects of auxin biosynthesis and its regulation. *Physiologia Plantarum*, 151, 3-12.
- Brumos J., L. M. Robles, J. Yun, T. C. Vu, S. Jackson, J. M. Alonso y A. N. Stepanova, (2018). Local auxin biosynthesis is a key regulator of plant development, *Developmental Cell*, 47, 306-318.
- Campanella, J. J., J. Ludwig-Müller, V. Bakllamaja, V. Sharma y A. Cartier (2003). ILR1 and sILR1 IAA amidohydrolase homologs differ in expression pattern and substrate specificity. *Plant Growth Regulation*, 41, 215-223.
- Campanella, J. J., A. F. Olajide, V. Magnus y J. Ludwig-Müller (2004). A novel auxin conjugate hydrolase from wheat with substrate specificity for longer side-chain auxin amide conjugates. *Plant Physiology*, 135, 2230-2240.
- Campanella, J. J., S. M. Smith, D. Leib, S. Wexler y J. Ludwig-Müller (2008). The auxin conjugate hydrolase family of *Medicago truncatula* and their expression during the interaction with two symbionts. *Journal of Plant Growth Regulation*, 27, 26-38.
- Campanella, J. J., S. Sigethy y J. Ludwig-Müller (2011). Truncation of *Medicago truncatula* auxin conjugate hydrolases alters substrate specificity. *Plant Molecular Biology Reporter*, 29, 745-752.
- Canché-Moor, R. L. R., A. Kú-González, C. Burgeff, V. M. Loyola-Vargas, L. C. Rodríguez-Zapata y E. Castaño (2006). Genetic transformation of *Coffea canephora* by vacuum infiltration. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 84, 373-377.
- Cho, M., E. M. Henry, D. R. Lewis, G. Wu, G. K. Muday y E. Spalding (2014). Block of ABCB19 ion channel activity by 5-nitro-2-(3-phenylpropylamino)-benzoic acid (NPPB) impairs polar auxin transport and root gravitropism. *Plant Physiology*, 166, 2091-2099.
- Couoh Dzul, O. J. (2017). Aislamiento, clonación y expresión del gen de la amidohidrolasa IAR3 de *Coffea canephora*, CICY, Mérida. 68 p.
- DaMatta, F. M. y J. D. C. Ramalho (2006). Impacts of drought and temperature stress on coffee physiology and production: a review. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 18, 55-81.
- Davies, R. T., D. H. Goetz, J. Lasswell, M. N. Anderson y B. Bartel (1999). IAR3 encodes an auxin conjugate hydrolase from Arabidopsis. *The Plant Cell*, 11, 365-376.
- Debergh, P. C. y R. H. Zimmerman (1993). Micropropagation. Technology and application, Kluwer Academic Publishers, Netherlands. 484 p.
- Denoeud, F., L. Carretero-Paulet, A. Dereeper, G. Droc, R. Guyot, M. Pietrella, C. Zheng, A. Alberti, F. Anthony, G. Aprea, J. M. Aury, P. Bento, M. Bernard, S. Bocs, C. Campa, A. Cenci, M. C. Combes, D. Crouzillat, C. Da Silva, L. Daddiego, F. De Bellis, S. Dussert, O. Garsmeur, T. Gayraud, V. Guignon, K. Jahn, V. Jamilloux, T. Joët, K. Labadie, T. Lan, J. Leclercq, M. Lepelley, T. Leroy, L. T. Li, P. Librado, L. Lopez, A. Muñoz, B. Noel, A. Pallavicini, G. Perrotta, V. Poncet, D. Pot, Priyono, M. Rigoreau, M. Rouard, J. Rozas, C. Tranchant-Dubreuil, R. VanBuren, Q. Zhang, A.
-

-
- C. Andrade, X. Argout, B. Bertrand, A. De Kochko, G. Graziosi, R. J. Henry, Jayarama, R. Ming, C. Nagai, S. Rounsley, D. Sankoff, G. Giuliano, V. A. Albert, P. Wincker y P. Lashermes (2014). The coffee genome provides insight into the convergent evolution of caffeine biosynthesis. *Science*, 345, 1181-1184.
- Dublin, P. (1981). Embryogenèse somatique directe sur fragments de feuilles de caféier Arabusta. *Café Cacao Thé*, 25, 237-242.
- Duarte-Aké, F. y C. De-la-Peña, (2016). Epigenetic advances in somatic embryogenesis in sequenced genome crops, en: *Somatic Embryogenesis: Fundamental Aspects and Applications*, Loyola-Vargas, V. M. y N. Ochoa-Alejo, (eds). Springer International Publishing. Cham. pp. 81-102.
- Eckardt, N. A. (2001). Auxin and the power of the proteasome in plants. *The Plant Cell*, 13, 2161-2163.
- Elhiti, M. y C. Stasolla, (2016). Somatic embryogenesis: The molecular network regulating embryo formation, en: *Somatic Embryogenesis in Ornamentals and Its Applications*, Mujib, A., (ed). Springer. India. pp. 217-229.
- Fehér, A., D. Bernula y K. Gémes, (2016). The many ways of somatic embryo initiation, en: *Somatic Embryogenesis: Fundamental Aspects and Applications*, Loyola-Vargas, V. M. y N. Ochoa-Alejo, (eds). Springer International Publishing. Cham. pp. 23-37.
- Fehér, A. (2019). Callus, dedifferentiation, totipotency, somatic embryogenesis: What these terms mean in the era of molecular plant biology? *Frontiers in Plant Science*, 10, 536.
- Feraru, E., S. Vosolsobe, M. I. Feraru, J. Petrášek y J. Kleine-Vehn (2012). Evolution and structural diversification of PILS putative auxin carriers in plants. *Frontiers in Plant Science*, 3, 227.
- Friml, J. y K. Palme (2002). Polar auxin transport – old questions and new concepts? *Plant Molecular Biology*, 49, 273-284.
- Friml, J., A. Vieten, M. Sauer, D. Weijers, H. Schwarz, T. Hamann, R. Offringa y G. Jurgens (2003). Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of *Arabidopsis*. *Nature*, 426, 147-153.
- Fukui, K. y K. i. Hayashi, (2019). New-generation chemical tools for the manipulation of auxin biosynthesis, action, and transport, en: *Phototropism: Methods and Protocols*, Yamamoto, K. T., (ed). Springer. New York. pp. 143-156.
- Gao, Y. y Y. Zhao, (2014). Auxin biosynthesis and catabolism, en: *Auxin and Its Role in Plant Development*, Zazimalová, E., J. Petrášek y E. Benková, (eds). Springer. Vienna. pp. 21-38.
- Geisler, M., J. J. Blakeslee, R. Bouchard, O. R. Lee, V. Vincenzetti, A. Bandyopadhyay, B. Titapiwatanakun, W. A. Peer, A. Bailly, E. L. Richards, K. F. K. Ejendal, A. P. Smith, C. Baroux, U. Grossniklaus, A. Muller, C. A. Hrycyna, R. Dudler, A. S.
-

-
- Murphy y E. Martinoia (2005). Cellular efflux of auxin catalyzed by the Arabidopsis MDR/PGP transporter AtPGP1. *The Plant Journal*, 44, 179-194.
- Geldner, N., J. Friml, Y. D. Stierhof, G. Jurgens y K. Palme (2001). Auxin transport inhibitors block PIN1 cycling and vesicle trafficking. *Nature*, 413, 425-428.
- George, E. F., (2008). Plant tissue culture procedure: background, en: *Plant propagation by tissue culture*, George, E. F., M. A. Hall y G. J. De Klerk, (eds). Springer. Dordrecht, The Netherlands. pp. 1-28.
- González-Lamothe, R., M. El Oirdi, N. Brisson y K. Bouarab (2012). The conjugated auxin indole-3-acetic acid-aspartic acid promotes plant disease development. *The Plant Cell*, 24, 762-777.
- Hagen, G., A. Kleinschmidt y T. Guilfoyle (1984). Auxin-regulated gene expression in intact soybean hypocotyl and excised hypocotyl sections. *Planta*, 162, 147-153.
- Hagen, G. y T. J. Guilfoyle (1985). Rapid induction of selective transcription by auxins. *Molecular and Cellular Biology*, 5, 1197-1203.
- Hatanaka, T., O. Arakawa, T. Yasuda, N. Uchida y T. Yamaguchi (1991). Effect of plant growth regulators on somatic embryogenesis in leaf cultures of *Coffea canephora*. *Plant Cell Reports*, 10, 179-182.
- He, C. y K. Ohnishi (2017). Efficient renaturation of inclusion body proteins denatured by SDS. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 490, 1250-1253.
- Herman, E. B. y G. J. Haas (1975). Clonal propagation of *Coffea arabica* L. from callus culture. *HortScience*, 10, 588-589.
- ICO (2019). Trade Statistics. Available online at: http://www.ico.org/trade_statistics.asp (Accessed March 2019).
- Knox, K. y J. S. Huffaker (1996). *Coffee basics. A quick and easy guide*, John Wiley & Sons, Inc., USA. 197 p.
- Korasick, D. A., T. A. Enders y L. C. Strader (2013). Auxin biosynthesis and storage forms. *Journal of Experimental Botany*, 64, 2541-2555.
- Krecek, P., P. Skupa, J. Libus, S. Naramoto, R. Tejos, J. Friml y E. Zazimalová (2009). The PIN-FORMED (PIN) protein family of auxin transporters. *Genome Biology*, 10, 249.
- Lange, B. M., M. Trost, W. Heller, C. Langebartels y H. Sandermann, Jr. (1994). Elicitor-induced formation of free and cell-wall-bound stilbenes in cell-suspension cultures of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). *Planta*, 194, 143-148.
- Lashermes, P., M. C. Combes, J. Robert, P. Trouslot, A. D'Hont, F. Anthony y A. Charrier (1999). Molecular characterisation and origin of the *Coffea arabica* L. genome. *Molecular and General Genetics*, 261, 259-266.
- LeClere, S., R. Tellez, R. A. Rampey, S. P. T. Matsuda y B. Bartel (2002). Characterization of a family of IAA-amino acid conjugate hydrolases from Arabidopsis. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 20446-20452.
-

-
- Lee, M., Y. Choi, B. Burla, Y. Y. Kim, B. Jeon, M. Maeshima, J. Y. Yoo, E. Martinoia y Y. Lee (2008). The ABC transporter AtABCB14 is a malate importer and modulates stomatal response to CO₂. *Nature Cell Biology*, 10, 1217-1223.
- Lee, O. y M. Cho, (2014). Trafficking of ABCB-type auxin transporters, en: *Plant ABC Transporters*, Geisler, M., (ed). Springer International Publishing. Switzerland. pp. 287-300.
- Ljung, K. (2013). Auxin metabolism and homeostasis during plant development. *Development*, 140, 943-950.
- Loyola-Vargas, V. M. y N. Ochoa-Alejo, (2016). Somatic embryogenesis. An overview, en: *Somatic embryogenesis. Fundamental aspects and applications*, Loyola-Vargas, V. M. y N. Ochoa-Alejo, (eds). Springer. Switzerland. pp. 1-10.
- Loyola-Vargas, V. M., J. R. Avilez-Montalvo, R. N. Avilez-Montalvo, R. E. Márquez-López, R. M. Galaz-Ávalos y E. Mellado-Mojica, (2016). Somatic embryogenesis in *Coffea* spp., en: *Somatic embryogenesis. Fundamental aspects and applications*, Loyola-Vargas, V. M. y N. Ochoa-Alejo, (eds). Springer. Switzerland. pp. 241-266.
- Ludwig-Müller, J. (2011). Auxin conjugates: their role for plant development and in the evolution of land plants. *Journal of Experimental Botany*, 62, 1757-1773.
- Márquez-López, R. E., C. A. Pérez-Hernández, Á. Kú-González, R. M. Galaz-Ávalos y V. M. Loyola-Vargas (2018). Localization and transport of indole-3-acetic acid during somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. *Protoplasma*, 255, 695-708.
- Martins, M. Q., A. S. Fortunato, W. P. Rodrigues, F. L. Partelli, E. Campostrini, F. C. Lidon, F. M. DaMatta, J. C. Ramalho y A. I. Ribeiro-Barros (2017). Selection and validation of reference genes for accurate RT-qPCR data normalization in *Coffea* spp. under a climate changes context of interacting elevated [CO₂] and temperature. *Frontiers in Plant Science*, 8, 307.
- Matthes, M. S., N. B. Best, J. M. Robil, S. Malcomber, A. Gallavotti y P. McSteen (2019). Auxin EvoDevo: Conservation and diversification of genes regulating auxin biosynthesis, transport, and signaling. *Molecular Plant*, 12, 298-320.
- Mattsson, J., Z. R. Sung y T. Berleth (1999). Responses of plant vascular systems to auxin transport inhibition. *Development*, 126, 2979-2991.
- Mravec, J., P. Skupa, A. Bailly, K. Hoyerova, P. Krecek, A. Bielach, J. Petrášek, J. Zhang, V. Gaykova, Y. D. Stierhof, P. I. Dobrev, K. Schwarzerova, J. Rolcik, D. Seifertova, C. Luschnig, E. Benková, E. Zazimalová, M. Geisler y J. Friml (2009). Subcellular homeostasis of phytohormone auxin is mediated by the ER-localized PIN5 transporter. *Nature*, 459, 1136-1140.
- Nic-Can, G. I. y V. M. Loyola-Vargas, (2016). The role of the auxins during somatic embryogenesis, en: *Somatic embryogenesis. Fundamental aspects and applications*, Loyola-Vargas, V. M. y N. Ochoa-Alejo, (eds). Springer. Switzerland. pp. 171-181.
- Nic-Can, G. I., J. R. Avilez-Montalvo, R. N. Avilez-Montalvo, R. E. Márquez-López, E.
-

-
- Mellado-Mojica, R. M. Galaz-Ávalos y V. M. Loyola-Vargas, (2016). The relationship between stress and somatic embryogenesis, en: Somatic embryogenesis. Fundamental aspects and applications, Loyola-Vargas, V. M. y N. Ochoa-Alejo, (eds). Springer. Switzerland. pp. 151-170.
- Noh, B., A. S. Murphy y E. P. Spalding (2001). Multidrug resistance-like genes of *Arabidopsis* required for auxin transport and auxin-mediated development. *The Plant Cell*, 13, 2441-2454.
- Nonhebel, H. M. (2015). Tryptophan-independent IAA synthesis: critical evaluation of the evidence. *Plant Physiology*, 169, 1001-1005.
- Okada, K., J. Ueda, M. K. Komaki, C. J. Bell y Y. Shimura (1991). Requirement of the auxin polar transport system in early stages of *Arabidopsis* floral bud formation. *The Plant Cell*, 3, 677-684.
- Perrot-Rechenmann, C. (2010). Cellular responses to auxin: division versus expansion. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2, a001446.
- Quiroz-Figueroa, F. R., M. Monforte-González, R. M. Galaz-Ávalos y V. M. Loyola-Vargas, (2006a). Direct somatic embryogenesis in *Coffea canephora*, en: Plant cell culture protocols, Loyola-Vargas, V. M. y F. A. Vázquez-Flota, (eds). Humana Press. Totowa, New Jersey. pp. 111-117.
- Quiroz-Figueroa, F. R., R. Rojas-Herrera, R. M. Galaz-Ávalos y V. M. Loyola-Vargas (2006b). Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 86, 285-301.
- Rampey, R. A., S. LeClere, M. Kowalczyk, K. Ljung, G. Sandberg y B. Bartel (2004). A family of auxin-conjugate hydrolases that contributes to free indole-3-acetic acid levels during *Arabidopsis* germination. *Plant Physiology*, 135, 978-988.
- Ruiz Rosquete, M., E. Barbez y J. Kleine-Vehn (2012). Cellular auxin homeostasis: gatekeeping is housekeeping. *Molecular Plant*, 5, 772-786.
- Savic, B., S. Tomic, V. Magnus, K. Gruden, K. Barle, R. Grenkovic, J. Ludwig-Müller y B. Salopek-Sondi (2009). Auxin amidohydrolases from *Brassica rapa* cleave the alanine conjugate of indolepropionic acid as a preferable substrate: a biochemical and modeling approach. *Plant and Cell Physiology*, 50, 1587-1599.
- Scanlon, M. J. (2003). The polar auxin transport inhibitor *N*-1-naphthylphthalamic acid disrupts leaf Initiation, KNOX protein regulation, and formation of leaf margins in maize. *Plant Physiology*, 133, 597-605.
- Schuller, A. y J. Ludwig-Müller (2006). A family of auxin conjugate hydrolases from *Brassica rapa*: characterization and expression during clubroot disease. *New Phytologist*, 171, 145-158.
- Singh, S. M., A. Sharma, A. K. Upadhyay, A. Singh, L. C. Garg y A. K. Panda (2012). Solubilization of inclusion body proteins using *n*-propanol and its refolding into bioactive form. *Protein Expression and Purification*, 81, 75-82.
- Söndahl, M. R. y W. R. Sharp (1977). High frequency induction of somatic embryos in
-

-
- cultured leaf explants of *Coffea arabica* L. Zeitschrift für Pflanzenphysiologie, 81, 395-408.
- Söndahl, M. R., J. L. Salisbury y W. R. Sharp (1979). SEM characterization of embryogenic tissue and globular embryos during high frequency somatic embryogenesis in *Coffee* callus cells. Zeitschrift für Pflanzenphysiologie, 94, 185-188.
- Staritsky, G. (1970). Embryoid formation in callus tissues of coffee. Acta Botanica Neederlandica, 19, 509-514.
- Staswick, P. E., B. Serban, M. Rowe, I. Tiryaki, M. T. Maldonado, M. C. Maldonado y W. Suza (2005). Characterization of an Arabidopsis enzyme family that conjugates amino acids to indole-3-acetic acid. The Plant Cell, 17, 616-627.
- Su, Y. H. y X. S. Zhang (2009). Auxin gradients trigger *de novo* formation of stem cells during somatic embryogenesis. Plant Signaling & Behavior, 4, 574-576.
- Su, Y. H., X. Y. Zhao, Y. B. Liu, C. L. Zhang, S. D. O'Neill y X. S. Zhang (2009). Auxin-induced WUS expression is essential for embryonic stem cell renewal during somatic embryogenesis in Arabidopsis. The Plant Journal, 59, 448-460.
- Sugimoto, K., S. P. Gordon y E. M. Meyerowitz (2011). Regeneration in plants and animals: dedifferentiation, transdifferentiation, or just differentiation? Trends in Cell Biology, 21, 212-218.
- Takahashi, W. y T. Takamizo, (2012). Molecular breeding of grasses by transgenic approaches for biofuel production, en: Transgenic Plants - Advances and Limitations, Ciftci, Y. Ö., (ed). InTech. Rijeka, Croatia. pp. 91-116.
- Tian, H., K. Wabnik, T. Niu, H. Li, Q. Yu, S. Pollmann, S. Vanneste, W. Govaerts, J. Rolcik, M. Geisler, J. Friml y Z. Ding (2014). WOX5-IAA17 feedback circuit-mediated cellular auxin response is crucial for the patterning of root stem cell niches in Arabidopsis. Molecular Plant, 7, 277-289.
- Tivendale, N. D., J. J. Ross y J. D. Cohen (2014). The shifting paradigms of auxin biosynthesis. Trends in Plant Science, 19, 44-51.
- Upadhyay, A. K., A. Singh, K. J. Mukherjee y A. K. Panda (2014). Refolding and purification of recombinant L-asparaginase from inclusion bodies of *E. coli* into active tetrameric protein. Frontiers in microbiology, 5, 486.
- Vinod, K., M. M. Naidu y G. A. Ravishankar (2006). Developments in coffee biotechnology- *in vitro* plant propagation and crop improvement. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 87, 49-65.
- Wang, H., C. e. Tian, J. Duan y K. Wu (2008). Research progresses on *GH3s*, one family of primary auxin-responsive genes. Plant Growth Regulation, 56, 225-232.
- Widemann, E., L. Miesch, R. Lugan, E. Holder, C. Heinrich, Y. Aubert, M. Miesch, F. Pinot y T. Heitz (2013). The amidohydrolases IAR3 and ILL6 contribute to jasmonoyl-isoleucine hormone turnover and generate 12-hydroxyjasmonic acid upon wounding in Arabidopsis leaves. Journal of Biological Chemistry, 288, 31701-
-

31714.

Xu, T., M. Wen, S. Nagawa, Y. Fu, J. G. Chen, M. J. Wu, C. Perrot-Rechenmann, J. Friml, A. M. Jones y Z. Yang (2010). Cell surface- and rho GTPase-based auxin signaling controls cellular interdigitation in *Arabidopsis*. *Cell*, 143, 99-110.

Yasuda, T., Y. Fujii y T. Yamaguchi (1985). Embryogenic callus induction from *Coffea arabica* leaf explants by benzyladenine. *Plant and Cell Physiology*, 26, 595-597.

Zhao, Y. (2014). Auxin biosynthesis. *The Arabidopsis Book*, 12, e0173.