



**“Producción recombinante de L-asparaginasa II
proveniente de *Salinispora tropica* CNB440 en
Escherichia coli.”**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los
requisitos para optar al Título de Ingeniera en Biotecnología Molecular.

Nyna Koyllor Llanovarcad Kawles

Director del Seminario de Título: Juan Asenjo

Co-Directora del Seminario de Título: Bárbara Andrews

Profesor Patrocinante: Claudia Stange Klein

Noviembre 2018

Santiago – Chile.



INFORME DE APROBACIÓN DE SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el seminario de Título, presentado por la **Srta. Nyna Koyllor Llanovarcad Kawles**.

“Producción recombinante de L-asparaginasa II proveniente de *Salinispora tropica* CNB440 en *Escherichia coli*.”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniera en Biotecnología Molecular.

Dr. Juan Asenjo De Leuze

Director del seminario de título.

Comisión Revisora y Evaluadora

Dr.

Presidente de la comisión

Dr.

Evaluador

Santiago de Chile, Noviembre del 2018.

*Dedicado a
Mi familia,
Sara Kawles et al.*

BIOGRAFÍA



Soy Nyna Koyllor Llanovarcad Kawles, nací en Lima, Perú, el nueve de marzo de 1991. Llegué a Chile a mis cinco años con mi madre y mi hermano, y luego de unos años llegó mi hermana, completando así nuestra familia. Desde pequeña fui muy curiosa, y a temprana edad decidí que quería estudiar para ser científica-detective, que para mi decepción no era una carrera. Con el paso de los años continué con las ganas de investigar y conocer del mundo de diferentes formas, una de ellas a través de la ciencia e investigación en el área de biología, lo que me llevó al descubrimiento de mi carrera durante enseñanza media, a la cual ingresé a mis veinte años empezando esta larga e interesante etapa de nuevos conocimientos.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco infinitamente a mi familia por todo su apoyo, no sólo en esta etapa, si no a lo largo de mi vida, sobre todo a mi madre por su fuerza y valor al sacar adelante a nuestra familia, incluso al partir de cero, siempre te admiraré por ello. También agradezco a mis dos hermanos, Kussy y Killko, con sus muy diferentes y únicas personalidades, por siempre estar allí y que, junto a mi madre y cuñado, me han acompañado en todo este largo y complejo proceso que fue de la mano con madurar. Agradezco también a mis pequeños sobrinos sólo por existir, por alegrarme la vida, y darme inspiración para querer hacer de este mundo un lugar mejor para ellos, los amo a todos, gracias totales. Además, quiero agradecer a todos mis amigos, a aquellos con los que comparto más de quince años de una leal amistad. A las grandes personas, amigos, que he tenido la suerte de conocer durante este proceso y cuyo cariño permanece intacto; y también a mis amigos del trabajo, con los que he tenido la fortuna de compartir esta etapa, que muchas veces se vuelve compleja, gracias por todos los consejos y las necesarias tardes de distracciones... Gracias a todos.

Finalmente quisiera agradecer a todos los compañeros del Centro de Biotecnología y Bioingeniería por hacer del lugar de trabajo un espacio ameno y alegre. Por último, a los profesores Juan Asenjo y Bárbara Andrews, por ser mis tutores de tesis y por las oportunidades otorgadas, y a Vida Rodríguez por su gran ayuda durante toda la tesis, por darle forma a este proyecto, por todos sus útiles consejos y sobre todo por su amabilidad y comprensión.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

<u>RESUMEN</u>	2
<u>ABSTRACT</u>	4
<u>1. INTRODUCCIÓN</u>	6
<u>1.1. L-Asparaginasa II</u>	6
<u>1.2. Aplicaciones de la L-asparaginasa.</u>	9
<u>1.3. Industria farmacéutica: Potencial Anticancerígeno</u>	10
<u>1.4. Efectos secundarios.</u>	12
<u>1.4.1. Actividad glutaminasa.</u>	13
<u>1.4.2. Respuesta inmunológica.</u>	13
<u>1.5. Procedencia de L-Asparaginasa II.</u>	15
<u>1.6. <i>Salinispora tropica</i>.</u>	16
<u>1.7. Objetivo General.</u>	17
<u>1.8. Objetivos específicos.</u>	17
<u>2. MATERIALES Y MÉTODOS</u>	18
<u>2.1. Reactivos Utilizados.</u>	18
<u>2.2. Material Biológico y condiciones de cultivo.</u>	18

<u>2.3.</u>	<u>Plásmidos utilizados.</u>	20
<u>2.4.</u>	<u>Obtención de secuencia y diseño de partidores.</u>	21
<u>2.5.</u>	<u>Extracción de DNA genómico a partir de cultivos de <i>Salinisora tropica</i> CNB 440.</u>	22
<u>2.6.</u>	<u>Amplificación del gen <i>Strop 0315</i> mediante PCR.</u>	22
<u>2.7.</u>	<u>Electroforesis en gel de agarosa.</u>	23
<u>2.8.</u>	<u>Extracción y purificación de DNA desde gel de agarosa.</u>	23
<u>2.9.</u>	<u>Extracción y purificación del plásmido pET22b(+) a partir de <i>E. coli</i> BL21(DE3).</u>	24
<u>2.10.</u>	<u>Digestión de DNA y plásmido pET22b(+) con enzimas de restricción.</u>	24
<u>2.11.</u>	<u>Ligación entre el vector de expresión y el gen <i>Strop 0315</i> digeridos.</u>	24
<u>2.12.</u>	<u>Preparación de <i>E. coli</i> BL21(DE3) quimiocompetentes.</u>	25
<u>2.13.</u>	<u>Transformación de <i>E. coli</i> BL21(DE3) quimiocompetentes.</u>	25
<u>2.14.</u>	<u>Inducción de proteína recombinante en <i>E. coli</i> BL21(DE3) con IPTG.</u>	26
<u>2.15.</u>	<u>Inducción de proteína recombinante en <i>E. coli</i> BL21(DE3) en medio autoinducible.</u>	27
<u>2.16.</u>	<u>Análisis de fracciones celulares.</u>	27
<u>2.17.</u>	<u>Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS PAGE).</u>	28
<u>2.18.</u>	<u>Tinción de geles de poliacrilamida con nitrato de plata.</u>	28
<u>2.19.</u>	<u>Western Blot.</u>	29

<u>2.20.</u>	<u>Cromatografía de afinidad Ni-NTA en columna PD10.</u>	29
<u>2.21.</u>	<u>Cromatografía Ni-NTA en batch.</u>	30
<u>2.22.</u>	<u>Ensayo cualitativo de actividad asparaginasa con rojo fenol.</u>	30
<u>2.23.</u>	<u>Ensayo cuantitativo de actividad asparaginasa y glutaminasa con reactivo de Nessler.</u>	31
<u>2.24.</u>	<u>Cuantificación de proteína mediante método de Bradford.</u>	32
<u>2.25.</u>	<u>Programas computacionales utilizados.</u>	32
<u>3.</u>	<u>RESULTADOS</u>	33
<u>3.1.</u>	<u>Obtención del gen que codifica la enzima L-asparaginasa II a partir de cultivos de <i>Salinispora tropica</i> CNB 440.</u>	33
<u>3.2.</u>	<u>Clonación del gen de L-asparaginasa II proveniente de <i>Salinispora tropica</i> CNB440 en <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3).</u>	35
<u>3.3.</u>	<u>Expresión del gen que codifica la enzima L-asparaginasa II en <i>E. coli</i> BL21(DE3).</u>	37
<u>3.4.</u>	<u>Ensayos de actividad asparaginasa y glutaminasa a partir de extractos crudos.</u>	47
<u>3.4.1.</u>	<u>Ensayo cualitativo de actividad asparaginasa con rojo fenol.</u>	47
<u>3.4.2.</u>	<u>Ensayo cuantitativo de actividad asparaginasa y glutaminasa con el reactivo de Nessler.</u>	48
<u>3.5.</u>	<u>Purificación de la enzima recombinante mediante cromatografía Ni-NTA.</u>	52
<u>3.6.</u>	<u>Estimación Actividad L-Asparaginasa II recombinante.</u>	56
<u>4.</u>	<u>DISCUSIÓN Y PROYECCIONES</u>	58

<u>5.</u>	<u>CONCLUSIONES</u>	70
<u>6.</u>	<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	71
<u>7.</u>	<u>ANEXO</u>	76

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA I. MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS.	19
TABLA II. PLÁSMIDOS UTILIZADOS Y GENERADOS DURANTE LA INVESTIGACIÓN.	20
TABLA III. SECUENCIA Y CARACTERÍSTICAS DE LOS PARTIDORES ASPST_FW Y ASPST_RV.	22

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. MECANISMO DE REACCIÓN DE L-ASPARAGINASA II.	7
FIGURA 2. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DEL MONÓMERO DE L-ASPARAGINASA II PROVENIENTE DE ERWINIA CHRYSANTHEMI.	7
FIGURA 3. ACCIÓN ANTINEOPLÁSICA DE LA L-ASPARAGINASA II.	12
FIGURA 4. ESQUEMA DEL PLASMIDIO PET22B(+).	21
FIGURA 5. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA AL 1% DE LA AMPLIFICACIÓN DEL GEN STROP_0315 CON LOS PARTIDORES ASPST_FW Y ASPST_RV.	33
FIGURA 6. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA DE LA AMPLIFICACIÓN DEL GEN STROP_0315 EN GRADIENTE ACOTADO DE TEMPERATURA.	34
FIGURA 7. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA AL 1% DEL GEL STROP_0315 PURIFICADO Y EL VECTOR PET22B(+), DIGERIDOS CON LAS ENZIMAS DE RESTRICCIÓN NDEI Y XHOI.	35
FIGURA 8. CULTIVOS DE <i>E. COLI</i> BL21(DE3) TRANSFORMADAS CON MEZCLAS DE LIGACIÓN DE PET22B(+) CON INSERTO.	36
FIGURA 9. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA AL 1% DEL PRODUCTO DE LA DIGESTIÓN DEL PLÁSMIDO OBTENIDO DESDE CEPA <i>E. COLI</i> BL21(DE3) TRANSFORMANTE.	37
FIGURA 10. ANÁLISIS DE FRACCIONES CELULARES CON SDS PAGE DE CÉLULAS <i>E. COLI</i> BL21(DE3) TRANSFORMADAS CON EL VECTOR PET22B(+)-ASP II.	38
FIGURA 11. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA 12,5% DE FRACCIONES OBTENIDAS DE LA PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD NINTA.	39
FIGURA 12. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA AL 12,5% DE FRACCIONES CELULARES DE CULTIVOS INDUCIDOS A 37°C CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE IPTG.	41

FIGURA 13. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA AL 12,5% DE FRACCIÓN CELULAR SOLUBLE E INSOLUBLE DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> BL21(DE3)-ASP11 (A) Y <i>ESCHERICHIA COLI</i> BL21(DE3)-ASP11/PLYSS (B), CULTIVADAS A 37°C SIN INDUCTOR.	42
FIGURA 14. CULTIVO DE <i>E. COLI</i> BL21 (DE3) EN LB AGAR, TRANSFORMADO CON LOS VECTORES PET22B(+)-ASP11 Y PLYSS (IZQUIERDA) Y PCR DE COLONIAS (DERECHA).	44
FIGURA 15. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA AL 12,5 % DEL EXTRACTO PROTEICO SOLUBLE OBTENIDO DE CULTIVOS INDUCIDOS A 25°C CON DISTINTAS CONCENTRACIONES DE IPTG.	45
FIGURA 16. WESTERN BLOT DEL EXTRACTO PROTEICO SOLUBLE OBTENIDO DE CULTIVOS INDUCIDOS A 25°C CON 0.1 Y 0.2 MM.	46
FIGURA 17. ENSAYO CUALITATIVO DE ACTIVIDAD ASPARAGINASA CON ROJO FENOL.	48
FIGURA 18. GRÁFICO DE MEDICIÓN DE ACTIVIDAD ASPARAGINASA A PARTIR DE EXTRACTOS PROTEICOS SOLUBLES OBTENIDOS DEL CULTIVO DE <i>E. COLI</i> ASP11/PLYSS INDUCIDA A 37°C, CON DISTINTAS CONCENTRACIONES DE IPTG.	50
FIGURA 19. GRÁFICO DE MEDICIÓN DE ACTIVIDAD ASPARAGINASA Y GLUTAMINASA A PARTIR DE EXTRACTOS PROTEICOS SOLUBLES OBTENIDOS DEL CULTIVO DE CEPAS <i>E. COLI</i> ASP11/PLYSS INDUCIDAS A 18°C, CON DISTINTAS CONCENTRACIONES DE IPTG.	51
FIGURA 20. GRÁFICO DE MEDICIÓN DE ACTIVIDAD ASPARAGINASA Y GLUTAMINASA A PARTIR DE EXTRACTOS PROTEICOS SOLUBLES OBTENIDOS DE CULTIVOS DE CEPAS <i>E. COLI</i> ASP11/PLYSS INDUCIDAS A 25°C, CON DISTINTAS CONCENTRACIONES DE IPTG.	52
FIGURA 21. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA AL 12,5%, DE MUESTRAS DE PURIFICACIÓN, MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD NI-NTA EN COLUMNA, OBTENIDAS DE CULTIVOS <i>E. COLI</i> ASP11/PLYSS INDUCIDOS A 25°C INDUCIDOS CON 0,1 MM DE IPTG.	53
FIGURA 22. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA AL 12,5 % CON MUESTRAS OBTENIDAS DE LA PURIFICACIÓN REALIZADA A CULTIVOS <i>E. COLI</i> ASP11/PLYSS INDUCIDOS A 25°C CON 0,1 MM DE IPTG Y SU RESPECTIVO CONTROL.	55

- FIGURA 23. ENSAYO DE ACTIVIDAD CON EL REACTIVO DE NESSLER, A PARTIR DE EXTRACTO PROTEICO SOLUBLE OBTENIDO DEL CULTIVO DE *E. COLI* ASP11/P1YSS INDUCIDA A 25°C CON 0.1 MM DE IPTG (A), Y DE MUESTRAS DE LA FRACCIÓN DE ELUCIÓN OBTENIDAS A PARTIR DE LA CROMATOGRFÍA EN BATCH DE LOS MISMOS CULTIVOS.** 56
- FIGURA 24. ESQUEMA DEL MECANISMO DE INTERACCIÓN ENTRE RESIDUOS DE HISTIDINAS, DE LA COLA DE POLIHISTIDINAS, CON LOS IONES NIQUELOSOS DE LA RESINA NI-NTA.** 63
- FIGURA 25. ESQUEMA DE LA ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE LA L-ASPARAGINASA II (ECA3) DE *E. COLI*, Y DE LA ASPARAGINASA-GLUTAMINASA DE *A. GLUTAMINASIFICANS*.** 67

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Grados Celcius
AIM	Medio autoinducible
ARN	Ácido ribonucleico
BSA	Albúmina de suero bovino
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO.	Densidad óptica
DMSO	Dimetil sulfóxido
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiamino tetra acético
g	Gramos
h	Horas
IPTG	Isopropil β -D-tiogalactósido
kDa	Kilodalton
Km	Constante de Michaelis-Menten
L	Litro
LB	Medio Luria Bertani
LLA	Leucemia linfoblástica aguda
M	Molar

min	Minutos
Ni-NTA	Niquel-nitriloacetato
nm	nanómetros
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de polimerasa
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundos
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TB	Medio Terrific Broth
TEMED	N,N,N',N'-tetrametil-etileno-diamina
Tris	2-Amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol

RESUMEN

La enzima L-asparaginasa II, que hidroliza L-asparagina en ácido aspártico y amonio, es utilizada actualmente como agente quimioterapéutico, en el tratamiento de leucemia linfoblástica aguda infantil, leucemia mieloblástica aguda (LLA), linfoma no Hodgkin, melanosarcoma y carcinoma hepatocelular entre otros, dado su efecto antineoplásico sobre ciertos tipos de células tumorales que son incapaces de producir L-asparagina y dependen de la circulante para su proliferación.

A pesar de su rol exitoso en el tratamiento de estas enfermedades, su uso es constantemente reevaluado ya que genera efectos secundarios, asociados a la actividad inespecífica de la enzima sobre un segundo sustrato estructuralmente similar a la L-asparagina, la glutamina, generando pancreatitis, disfunción renal, trombosis, hemorragia y reacciones de hipersensibilidad. Además, otro factor que afecta su uso en tratamientos a largo plazo es la generación de anticuerpos en los tejidos posterior a su aplicación, neutralizando su efecto sobre células tumorales.

La presencia de esta enzima se ha descrito en diversos organismos, siendo las actualmente utilizadas las producidas por microorganismos. Entre ellos, las bacterias marinas del orden actinobacteria son de gran interés, ya que se han descrito L-asparaginasa II sin actividad glutaminasa. Dado el interés por encontrar nuevas asparaginasa II con baja o nula actividad glutaminasa es que se estudió una nueva L-asparaginasa II descrita en el genoma de la actinobacteria *Salinispora tropica* CNB 440 que hasta el momento no ha sido caracterizada.

Para ello el gen que codifica la enzima L-asparaginasa II fue amplificado a partir del genoma de *S. tropica* CNB 440 y clonado en el vector de expresión pET22b(+), con el

cual se quimiotransformó cepas de *E. coli* BL21(DE3) quimiocompetentes. Dada la presencia de inducción basal, las cepas fueron co-transformadas con el vector pLysS, obteniendo colonias doble transformantes de *E. coli* BL21(DE3) ASPII/pLysS, solucionando este problema. Posteriormente se indujo la expresión del constructo en células co-transformadas con IPTG, obteniendo la expresión de la proteína recombinante de forma soluble para los cultivos inducidos a 25°C con 0.1 y 0.2 mM de IPTG. Luego se evaluó la actividad a 37°C de la enzima L-asparaginasa II a partir de extractos crudos de los cultivos anteriores, mediante Nesslerización para los sustratos L-asparagina y L-glutamina, obteniendo exclusivamente actividad asparaginasa por parte de la enzima.

Luego se realizó purificación de la proteína recombinante mediante cromatografía en columna Ni-NTA, obteniendo muchas proteínas contaminantes, por lo que se utilizó la técnica de cromatografía Ni-NTA en batch, para aumentar la especificidad por la proteína recombinante; sin embargo, su correcta purificación no fue posible. Finalmente se realizó una estimación de la actividad enzimática a partir de la muestra de extracto crudo inducido a 25°C con 0.1 mM de IPTG, obteniéndose una actividad específica de la L-asparaginasa II de 117,81 U/mg y no actividad sobre L-glutamina.

ABSTRACT

The enzyme L-asparaginase II, which hydrolyzes L-asparagine to aspartic acid and ammonium, is currently used as a chemotherapeutic agent in the treatment of acute lymphoblastic leukemia, acute myeloblastic leukemia, non-Hodgkin lymphoma, melanosarcoma and hepatocellular carcinoma, among others, due to its antineoplastic effect on certain types of tumor cells that are incapable of producing L-asparagine and depend on the circulating L-asparagine for their proliferation.

Despite its successful role in the treatment of these diseases, its use is constantly re-evaluated since it generates secondary effects, associated with the specificity of the enzyme to a second substrate due to its structural similarity, glutamine. These effects include pancreatitis, renal dysfunction, thrombosis, hemorrhage and hypersensitivity reactions. In addition, another factor that affects its use in long-term treatments is the generation of antibodies in the tissues after its application, neutralizing its effect on tumor cells.

Asparaginases are distributed among living organisms, and those produced by microorganisms are currently used. Among them, marine bacteria of the actinobacteria order are of great interest, since L-asparaginases II without glutaminase activity has been reported. Given the interest in finding new asparaginases with low or no glutaminase activity, a new L-asparaginase II described in the genome of the actinomycete *Salinispora tropica* CNB 440 that has not been characterized yet, was studied.

To accomplish this, the gene coding for the enzyme L-asparaginase II was amplified from the genome of *S. tropica* CNB 440 and cloned into the expression vector pET22b(+), which was used to chemotransform chemocompetent *E. coli* BL21 (DE3) strains. Given the presence of basal induction, the strains were co-transformed with the vector pLysS,

obtaining double transformant colonies named *E. coli* BL21(DE3) ASP11/pLysS, solving this problem. Subsequently, the expression of the construct was induced with IPTG in co-transformed cells, obtaining the expression of the recombinant protein in a soluble form for the cultures induced at 25 ° C with 0.1 and 0.2 mM of IPTG. The activity at 37°C of the enzyme L-asparaginase II was evaluated from crude extracts of the cultures, by Nesslerization for the substrates L-asparagine and L-glutamine, obtaining only asparaginase as enzymatic activity.

Purification of the recombinant protein was initially performed by Ni-NTA column chromatography, obtaining a low-purity recombinant protein, so the technique was varied to Ni-NTA chromatography in batch, to increase the affinity for the asparaginase. However, its correct purification was not possible. Finally, an estimation of the enzymatic activity was made from crude extract induced at 25°C with 0.1 mM of IPTG, obtaining a specific activity of L-asparaginase II of 117.81 U/mg, and no activity on L-glutamine.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. L-Asparaginasa II

La enzima L-Asparaginasa II (L-Asparaginasa amidohidrolasa, EC 3.5.1.1), cuya principal función es la hidrólisis de L-asparagina en ácido aspártico y amonio, es de gran interés en el ámbito médico dado su potencial anticancerígeno y su uso como agente quimioterapéutico en ciertos tipos de cáncer como leucemia linfoblástica aguda infantil (LLA), leucemia mieloblástica aguda, enfermedad de Hodgkin, linfoma no hodgkin, melanosarcoma (Wakil & Adelegan, 2015) y carcinoma hepatocelular (Senthil Kumar et al., 2014).

El proceso de hidrólisis de asparagina ocurre en dos pasos a través de un intermediario beta-acyl-enzima; En la primera etapa del proceso, el residuo nucleofílico de la enzima es activado por una base fuerte y ataca el átomo de carbono de la amida de la L-asparagina (sustrato), generando el intermediario. La segunda parte de la reacción es un ataque al carbono del éster, producido por un nucleófilo activado de una molécula de agua (Figura 1) (Cachumba et al., 2016).

La L-asparaginasa en su forma activa consiste en un tétramero de 138,000-141,000 Da, con cuatro subunidades idénticas de 35,000 Da aproximadamente (Figura 2), con un centro activo cada una. Además, se han registrado asparaginasas de microorganismos mesófilos y termófilos que se presentan como dímeros, tetrámeros o hexámeros en su forma activa (Chohan & Rashid, 2013).

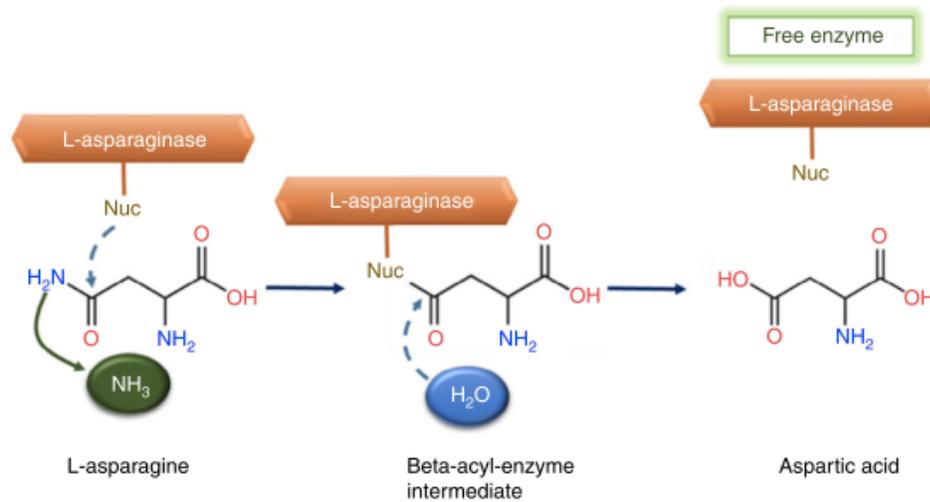


Figura 1. Mecanismo de reacción de L-asparaginasa II. El proceso de hidrólisis ocurre en dos pasos, a través de un intermediario beta-acyl-enzima. Las líneas discontinuas representan los ataques nucleofílicos, por un residuo de la enzima en el primer paso y por la molécula del agua en el segundo. Extraído de Cachumba et al., 2016.

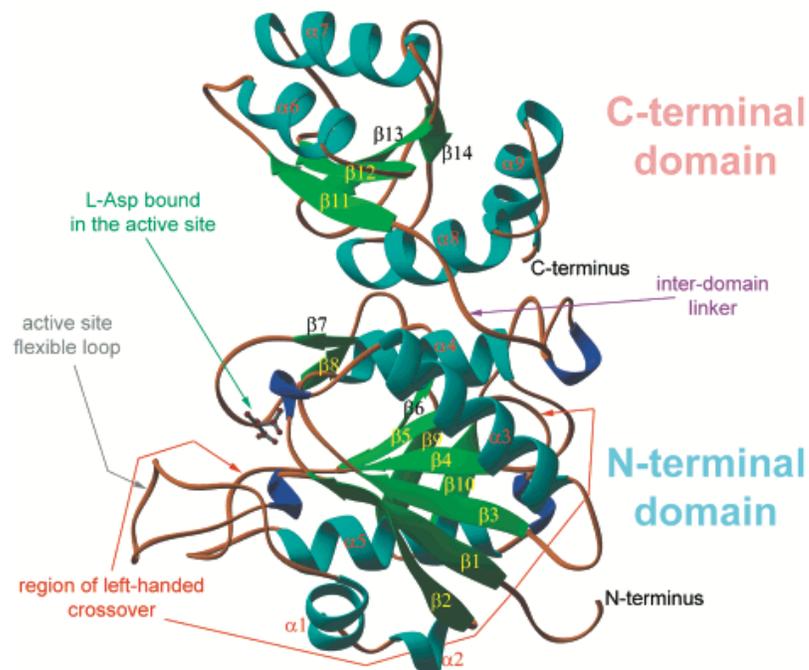


Figura 2. Representación esquemática del monómero de L-asparaginasa II proveniente de *Erwinia chrysanthemi*. En la figura se indican los elementos de la

estructura secundaria en diferentes colores: α -hélice en turquesa, lámina- β en verde y giros- β en azul. El sitio activo se indica con una flecha ploma y la molécula de L-asparagina unida al sitio activo de la enzima se indica con una flecha verde. Extraído de Aghaiypour et al., 2001.

La mayoría de las asparaginidas además poseen actividad inespecífica por un segundo sustrato, glutamina, el que es hidrolizado en ácido glutámico y amonio. Para la L-asparaginida II dicha actividad es de entre 2-10% respecto a la hidrólisis de asparagina (Müller & Boos, 1998). Se descubrió que D-asparagina y D-glutamina son metabolizados en el mismo centro activo que sus isómeros ópticos, pero a tasas menores (Nakamura et al., 2014).

Las asparaginidas disponibles para tratamiento médico actualmente provienen de *Escherichia coli* y *Erwinia chrysanthemi*. Su alta especificidad por asparagina se manifiesta en bajas constantes de Michaelis-Menten (K_m), poseyendo una K_m de 12 μM y 10 μM y una vida media aparente de 0.65 ± 0.13 y 1.24 ± 0.17 días posterior a la inyección intramuscular, para las asparaginidas provenientes de *E. chrysanthemi* y *E. coli* respectivamente. En contraste la K_m para glutamina es aproximada 100 veces mayor en ambos casos (Müller & Boos, 1998).

En el caso de la bacteria *E. coli* existen dos tipos de asparaginida, las cuales se clasifican según su origen celular; la asparaginida I (EC1) se localiza en el citoplasma, mientras que la asparaginida II (EC2) se encuentra en el espacio periplasmático, poseyendo sólo esta última actividad antitumoral (Van Den Berg, 2011). Estas dos enzimas difieren en varios aspectos, tanto en su secuencia como en su solubilidad en sulfato de amonio, comportamiento cromatográfico, actividad enzimática en función del

pH y actividad inespecífica, poseyendo la primera mayor actividad glutaminasa, llegando a ser aproximadamente la mitad con respecto a su actividad asparaginasa (Campbell et al., 1967).

1.2. Aplicaciones de la L-asparaginasa.

La L-asparaginasa II se utiliza principalmente en la industria farmacéutica, como agente quimioterapéutico, y en la industria alimenticia, para evitar la formación de acrilamida en alimentos fritos u horneados.

En los últimos años, se ha implementado el uso de L-asparaginasa en el procesamiento de alimentos, cuyo gran porcentaje son fritos u horneados, para generar productos alimenticios libres de acrilamida. La acrilamida se forma por la reacción de L-asparagina con azúcares reductores, por lo que la desaminación de la asparagina por parte de la enzima previene su formación. Esta reacción ocurre al hornear o freír alimentos a temperaturas por sobre los 120°C y no en alimentos hervidos. La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) ha catalogado a la acrilamida como un producto “probablemente cancerígeno para el humano” (IARC, 1994) y se han establecido sus efectos tóxicos intrínsecos como neurotoxicidad, carcinogenicidad y genotoxicidad de células somáticas y germinales en modelos animales (Singh & Srivastava, 2012). Se ha comprobado que el uso de L-asparaginasa antes de hornear o freír los alimentos procesados disminuye hasta en un 99% los niveles de acrilamida en el producto final, ya que reduce en más del 88% de la concentración de L-asparagina de la materia prima. De esta forma, se reducen sus efectos negativos, sin perjudicar sus características organolépticas (Cachumba et al., 2016).

En la industria farmacéutica, el uso de L-asparaginasa es de gran interés debido a su efecto antineoplásico selectivo sobre ciertos tipos de células tumorales. Estas células no pueden sintetizar L-asparagina por su cuenta, y dependen de la circundante para su crecimiento; por lo que la hidrólisis del aminoácido por parte de la L-asparaginasa II, genera desnutrición en este tipo de células y regresión tumoral. Es esta aplicación la que ha motivado el desarrollo del presente trabajo de tesis, ya que se buscan nuevas fuentes de L-asparaginasas II con baja o nula actividad glutaminasa

1.3. Industria farmacéutica: Potencial Anticancerígeno

El descubrimiento del potencial anticancerígeno de L-asparaginasa II fue en 1953, cuando se observó que los linfomas en ratones detenían su crecimiento después del tratamiento con suero de cobayo, atribuyendo en estudios posteriores la regresión de los tumores a la actividad de la enzima presente en él (Müller & Boos, 1998).

La L- asparagina es un aminoácido no esencial utilizado por proteínas estructurales de células normales y tumorales. Las células normales poseen la enzima asparagina sintetasa, la cual genera L-asparagina a partir de aspartato y amonio (Singh & Srivastava, 2012). Al contrario, ciertos tipos de células tumorales son incapaces de sintetizar suficiente asparagina para su metabolismo cuando no hay suministro nutricional del aminoácido, abasteciéndose únicamente de la L-asparagina circundante.

La deficiencia de asparagina perjudica rápidamente la síntesis de proteínas y conduce a una inhibición retardada en la síntesis de DNA y RNA y por lo tanto a un deterioro de la función celular provocando la muerte de las células (Müller & Boos, 1998). A esta propiedad se debe el efecto antitumoral de la L-asparaginasa II, la cual al hidrolizar la asparagina circundante genera el agotamiento de éste aminoácido y así la muerte

selectiva de este tipo de células tumorales por desnutrición (Figura 3) (Andrade et al., 2014).

Se posee evidencia de que la sensibilidad a la L-asparaginasa está fuertemente relacionado con el tipo de tumor, específicamente con las anomalías genéticas que presentan. Por ejemplo, el cariotipo de células leucémicas con hiperdiploidia y el rearrreglo cromosomal TEL-AML1 son las más sensibles a la acción de la enzima, mostrando mejor respuesta al tratamiento (Andrade et al., 2014), mientras que los subtipos de LLA de alto riesgo como células BRC-ABL positivos y derivadas de linfocitos T son menos susceptibles al tratamiento con la enzima (Van Den Berg, 2011).

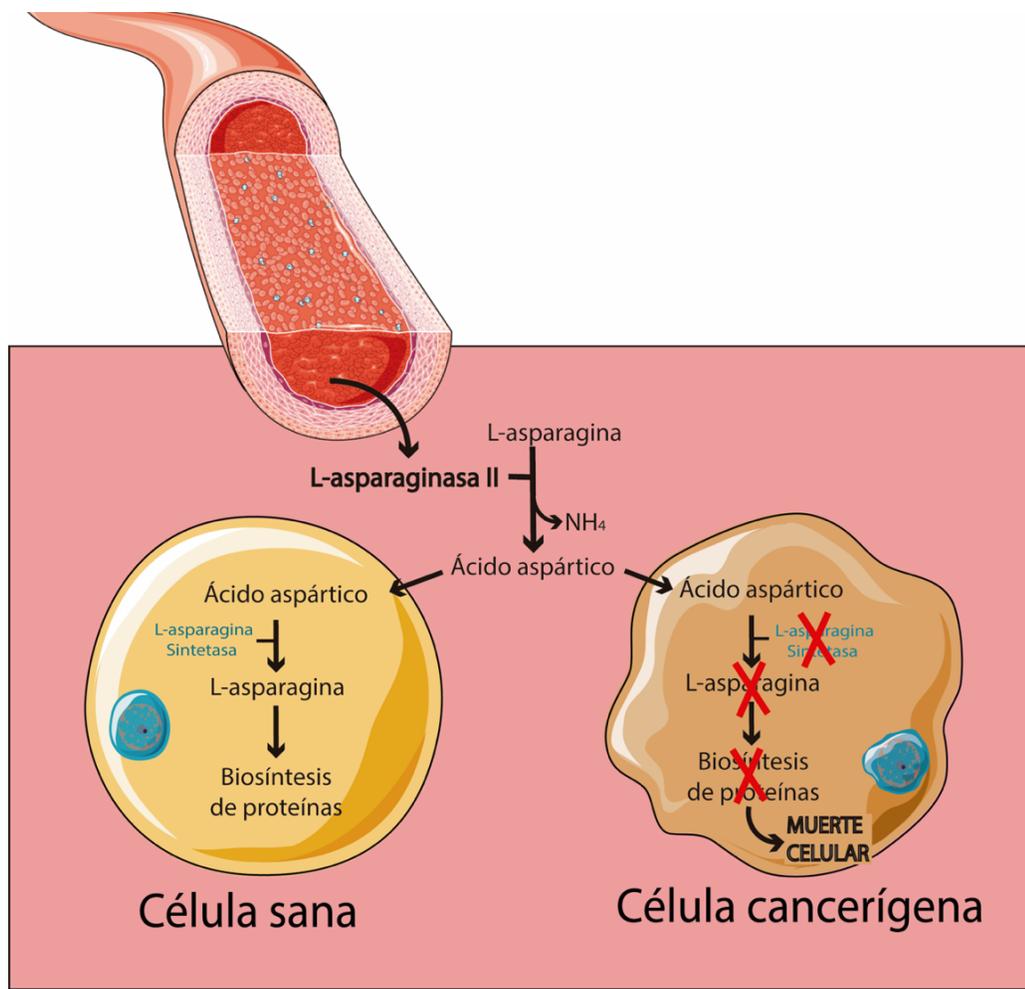


Figura 3. Acción antineoplásica de la L-asparaginasa II. Esquema que representa la depleción de L-asparagina circundante por efecto de la L-asparaginasa II, provocando así la muerte selectiva de ciertos tipos de células tumorales, incapaces de sintetizarla.

Estudios han demostrado que la L-asparaginasa II presenta gran eficacia clínica especialmente en el tratamiento de desórdenes hematológicos, como en el caso de la leucemia linfoblástica aguda, neoplasia infantil más común, y linfomas no Hodgkin, los cuales responden favorablemente ante la acción de la enzima; por lo que actualmente la L-Asparaginasa II es uno de los principales componentes del tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda (Van Den Berg, 2011) y ha sido un agente esencial en protocolos de quimioterapia desde hace treinta años (Cachumba et al., 2016).

Se ha logrado grandes mejoras en el tratamiento de LLA, con tasas exitosas de supervivencia a largo plazo de aproximadamente 80% en la últimas décadas (Andrade et al., 2014) y en el caso de la administración combinada con quimioterapia se registraron tasas de remisión inicial de hasta un 95% (Müller & Boos, 1998). A pesar de las tasas éxito significativas, cerca de un 20% de los pacientes aún presentan problemas en el tratamiento, como efectos secundarios causados por toxicidad de la enzima, reacciones de hipersensibilidad y disminución en su acción terapéutica, lo que justifica la necesidad de nuevas estrategias en el tratamiento.

1.4. Efectos secundarios.

A pesar de la alta tasa de éxito de la L-asparaginasa II en el tratamiento de distintos tipos de trastornos de origen hematológico, existen factores limitantes. Aproximadamente un 20% de los pacientes presentan problemas en el tratamiento como hipersensibilidad o inactivación inmunológica tras la aplicación de la enzima de origen

bacteriano o efectos de toxicidad relacionados con una actividad secundaria de la enzima (Andrade et al., 2014).

1.4.1. Actividad glutaminasa.

La mayor parte de los efectos secundarios son atribuidos a la afinidad por parte de las enzimas comerciales a un segundo sustrato, glutamina, cuya hidrólisis genera ácido glutámico y amonio. Esta actividad secundaria intrínseca por parte de algunas L-asparaginasas, de entre un 2 a un 10% de su actividad total (Müller & Boos, 1998), puede generar toxicidad ocasionando disfunción renal, pancreatitis, leucopenia, hiperglicemia, disfunción neurológica y anomalías en la coagulación conducentes a trombosis intracraneal o hemorragia (Dias et al., 2016; Mahajan et al., 2014; Mahajan et al., 2012)

Por lo tanto es necesario encontrar formas de producir L-asparaginasas con alta afinidad por L-asparagina, baja o nula actividad glutaminasa, y vida suficiente bajo condiciones fisiológicas (Mahajan et al., 2014; Mahajan et al., 2012). En el intento se han explorado diferentes microorganismos con resultados prometedores, encontrando nuevas fuentes de asparaginasas, entre las que destacan las enzimas aisladas de *Aspergillus oryzae* (Dias et al., 2016), de *Pectobacterium carotovorum* (Kumar et al., 2011) y de *Streptomyces noursei* (Senthil Kumar. et al., 2014), todas ellas sin actividad glutaminasa.

1.4.2. Respuesta inmunológica.

Ya que la L-asparaginasa II no es una proteína propia del ser humano (Van Den Berg, 2011), otro factor limitante en el tratamiento con L-asparaginasa II es la generación de anticuerpos contra la L-asparaginasa II de *E. coli*, que se detectan aproximadamente en un 42% de los pacientes tratados (Van Den Berg, 2011).

Se ha establecido una clara relación entre la producción de anticuerpos y el desarrollo de reacciones de hipersensibilidad que van desde anafilaxis sistémica hasta eritema localizado o dolor en el sitio de administración. La producción de anticuerpos aparte de generar reacciones de hipersensibilidad también puede generar un incremento de la tasa de inactivación de la enzima. Además en algunos pacientes la L-asparaginasa se inactiva rápidamente sin signos clínicos de hipersensibilidad, fenómeno que se denomina “inactivación silenciosa” (Andrade et al., 2014; Müller & Boos, 1998).

El desarrollo de la resistencia al medicamento genera pérdida en la efectividad de la enzima durante el tratamiento, requiriéndose un cambio a otra fuente de L-asparaginasa (Dias et al., 2016). Sólo cerca de un 25% de los pacientes que mostraron reacciones alérgicas a la asparaginasa de *E. coli* también presentaron reacciones alérgicas a la proveniente de *Erwinia chrysanthemi* (Andrade et al., 2014).

Además del cambio entre distintas fuentes de asparaginasas, se han desarrollado nuevas formas de la enzima menos reactivas, mediante la pegilación de la L-asparaginasa II de *E. coli* (PEG-Asparaginasa), esterificación de la enzima con polietilenglicol monometil éter, con el fin de reducir la inmunogenicidad. Con esto, no sólo se ha logrado aminorar en más de un 50% la inmunogenicidad de la asparaginasa, sino que también disminuir la frecuencia de las dosis al aumentar la vida media de la enzima sin afectar su eficacia (Van Den Berg, 2011). A partir de la neutralización del fármaco resulta de gran interés buscar nuevas fuentes de L-asparaginasas serológicamente diferentes, pero con un efecto terapéutico similar (Jain et al., 2012).

1.5. Procedencia de L-Asparaginasa II.

Se ha descrito la presencia de la L-asparaginasa en variados organismos, desde mamíferos, aves, plantas, levaduras hasta un amplio rango de bacterias. A pesar de que también se produce por organismos pluricelulares, el principal origen de la enzima son los microorganismos (Cachumba et al., 2016). Éstos son fuente de diversos metabolitos secundarios con potencial farmacológico, además de ser eficientes productores de proteínas gracias a herramientas de ingeniería metabólica.

Las asparaginastas utilizadas actualmente en tratamientos médicos provienen de bacterias de la familia Enterobacteriaceae, como las producidas por *Escherichia coli* y *Erwinia chrysanthemi*, además de la enzima conjugada con polietilenglicol, PEG-Asparaginasa, derivada de *E. coli* que se utiliza en el tratamiento de pacientes hipersensibles de alto riesgo (Van Den Berg, 2011). En el caso de las asparaginastas utilizadas en la industria alimentaria para la reducción de acrilamida, estas provienen de los hongos *Aspergillus oryzae* y *Aspergillus niger*; además estudios recientes han demostrado actividad en hongos provenientes de ambientes marinos (Cachumba et al., 2016).

Asimismo, se han logrado identificar diferentes microorganismos productores de la L-Asparaginasa II con el fin de utilizarlos en un futuro como agentes quimioterapéuticos, entre ellos destacan las bacterias de los géneros *Pseudomonas*, *Serratia*, *Proteus*, *Saccharomyces*, *Aerobacter*, *Bacillus*, *Xanthomonas*, *Photobacterium*, *Vibrio*, *Escherichia coli*, *Erwinia chrysanthemi* y Actinomycetales del género *Streptomyces*, además de hongos como de los géneros *Penicillium* y *Fusarium* (Cachumba et al., 2016; Jain et al., 2012).

Entre los diversos microorganismos, las bacterias del orden Actinomycetales destacan por su producción de metabolitos secundarios, representando el 45% del total de metabolitos bioactivos descubiertos, que incluyen agentes antibacterianos, antifúngicos, antitumorales, inmunosupresivos y en su mayoría antibióticos (Dineshkumar et al., 2014; Jayaprakashvel, 2012). En las últimas dos décadas en la búsqueda de nuevas fuentes de metabolitos, los actinomycetales marinos han llamado la atención, probando ser eficientes productores de nuevos metabolitos que muestran un amplio rango de actividades biológicas a pesar de representar sólo un 10% de las bacterias aisladas de sedimentos marinos (Solanki, & Khanna, 2008), convirtiendo así el entorno marino en un recurso primordial de investigación (Jayaprakashvel, 2012).

Entre los nuevos actinomycetales marinos aislados, se ha descrito la producción de la L-asparaginasa II por parte de *Streptomyces noursei* (Dharmaraj, 2011), *Streptomyces* sp.PDK2 (Dhevagi & Poorani, 2006) y *Streptomyces radiopugnans*, cuya asparaginasa no posee actividad glutaminasa y cuya citotoxicidad ha sido probada en modelos de carcinoma hepatocelular (Senthil Kumar et al., 2014).

1.6. *Salinispora tropica*.

En el orden de actinomycetales marinos también se encuentran las bacterias aeróbicas, gram positivas del género *Salinispora*, aisladas de sedimentos marinos. Dentro de este género una de las especies que ha sido bien caracterizada y cuyo metabolismo ha sido modelado es la especie *Salinispora tropica*, conocida por sintetizar diversos metabolitos como Salinosporamida A, un potente agente anticancerígeno, y sporolides A y B los cuales poseen actividad antibiótica (Contador et al., 2015; Dineshkumar et al., 2014).

Dentro de la secuencia genómica de la cepa *Salinispora tropica* CNB 440 se ha detectado la presencia de una secuencia que codifica una L-asparaginasa II, que hasta el momento no ha sido caracterizada. Dada las prometedoras asparaginasas descubiertas en el género *Streptomyces* y la cercanía filogenética con *Salinispora*, es que resulta de gran interés estudiar y caracterizar esta nueva asparaginasa; por ello el presente seminario de título se enfocará en la producción heteróloga de la enzima y la evaluación de su especificidad por sustratos en busca de una nueva L-asparaginasa con poca o nula actividad glutaminasa y serológicamente diferente con el objeto de evaluar si es un posible blanco para su utilización en futuras terapias.

1.7. Objetivo General.

Expresar en *Escherichia coli* el gen que codifica la enzima L-asparaginasa II proveniente de la bacteria *Salinispora tropica* CNB 440 y evaluar su especificidad por sustrato.

1.8. Objetivos específicos.

- I. Obtener el gen que codifica la enzima L-asparaginasa II a partir de cultivos de *Salinispora tropica* CNB 440.
- II. Clonar el gen que codifica la L-asparaginasa II proveniente de *Salinispora tropica* CNB440 en *Escherichia coli* BL21(DE3).
- III. Expresar el gen que codifica la enzima L-asparaginasa II en *Escherichia coli* BL21(DE3).
- IV. Purificar la enzima recombinante mediante cromatografía de afinidad a metales.
- V. Realizar ensayos de actividad de la L-asparaginasa II recombinante y evaluar su actividad asparaginasa y glutaminasa.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Reactivos Utilizados.

Acrilamida-Bisacrilamida 29:1 30%, ácido cítrico, almidón, cloruro de sodio, glicerol, nitrato de plata, SDS, temed, Tris de Winkler. Ácido etilendiamiotetraacético (EDTA), ácido bórico, ácido clorhídrico, ácido tricloroacético (TCA), albúmina de suero bovino (BSA), bromuro de potasio, carbonato de sodio, cloruro de calcio, cloruro de magnesio, cloruro de potasio, formaldehído, fosfato monopotásico, fosfato disódico, glucosa, hidróxido de sodio, imidazol, lactosa, sucrosa, sulfato de magnesio, sulfato de amonio y urea de Merck. Extracto de levadura, pepetona, triptona de Becton, Dickinson and Co. Cloruro de estroncio, cloruro de cobalto (II) y fluoruro sódico, J.T.Baker. Azul de coomassie, Lisozima y rojo fenol de Sigma. Ácido acético glacial de PanReac Applichem ITW Reagents. Azul de bromofenol PlusOne de Pharmacia Biotech

2.2. Material Biológico y condiciones de cultivo.

En el trabajo se utilizaron las cepas *Salinispora tropica* CNB 440 (proporcionada por el Dr. Paul Jensen) y *Escherichia coli* BL21(DE3). Además, durante este trabajo se generaron las cepas *Escherichia coli* BL21(DE3)-ASPII y *Escherichia coli* BL21(DE3)-ASPII/pLysS, siendo esta última producto de la co transformación de *Escherichia coli* BL21(DE3) con el vector de expresión pET22b(+)-ASPII, que posee el gen que codifica la L-asparaginasa II, y con el vector pLysS. La composición de los medios de cultivo se resume en la Tabla I.

Tabla I. Medios de cultivo utilizados.

Medio de Cultivo	Composición del medio de cultivo.
M1 SF2	Para 1 litro de medio se utilizan 10 g de almidón, 2 g de triptona, 4 g de extracto de levadura, 24 g de cloruro de sodio, 8.9 g de sulfato de magnesio, 0.57 g de cloruro de calcio, 0.69 g de cloruro de potasio, 0.086 g de bromuro de potasio, 0.0155 g de cloruro de estroncio, 0.0215 g de ácido bórico, 0.000208 de cloruro de cobalto (II), 0.0021 g de fluoruro sódico.
Luria Bertani (LB)	Para 1 litro de medio se utilizan 10 g de peptona, 5 g de extracto de levadura y 10 g de cloruro de sodio.
Luria Bertani (LB) agar.	Para 1 litro de medio se utilizan 10 g de peptona, 5 g de extracto de levadura, 10 g de cloruro de sodio y 15 g de agar.
Terrific Broth (TB)	Para 900 mL de solución, se agregan 12 g de triptona, 24 g de extracto de levadura, 4 mL de glicerol. Luego de esterilizar el medio se agregan 100 mL de una solución estéril de KH_2PO_4 0,17 M y K_2HPO_4 0.72 M (2.31 g de KH_2PO_4 y 12.54 g de K_2HPO_4 para 100 mL de solución).

Medio auto inducible (AIM)	Para 1 litro de solución, se agregan 12 g de triptona, 21 g de extracto de levadura, 3.3 g de sulfato de amonio, 6.8 g de fosfato monopotásico, 7.1 g de fosfato disódico, 0.5 g de glucosa, 2.0 g de lactosa y 0.15 g de sulfato de magnesio.
----------------------------	--

2.3. Plásmidos utilizados.

Los plásmidos utilizados y generados se resumen en la tabla II. Todos los plásmidos se encuentran integrados en cepas de *E. coli* BL21(DE3).

Tabla II. Plásmidos utilizados y generados durante la investigación.

Plásmido	Característica.
pET22b(+)	Vector de expresión de 5493 pares de bases (pb) con el promotor T7, sitios de múltiple clonamiento, secuencia que codifica la etiqueta de hexahistidina y resistencia a ampicilina.
pLysS	Es un plásmido derivado de pACYC184 que codifica la lisozima T7, el cual es un inhibidor de la T7 RNA polimerasa, que sirve para reprimir la expresión basal de genes bajo la expresión del promotor T7. Posee resistencia a cloranfenicol.
pET22b(+)-ASPII	Vector de expresión pET22b(+) con el gen <i>Strop_0315</i> inserto entre el sitio de corte de <i>NdeI</i> y <i>XhoI</i> , bajo la acción del promotor

	<p>T7 y adyacente a la secuencia que codifica la etiqueta de hexahistidina. Posee resistencia a ampicilina. Plásmido generado durante este trabajo.</p>
--	---

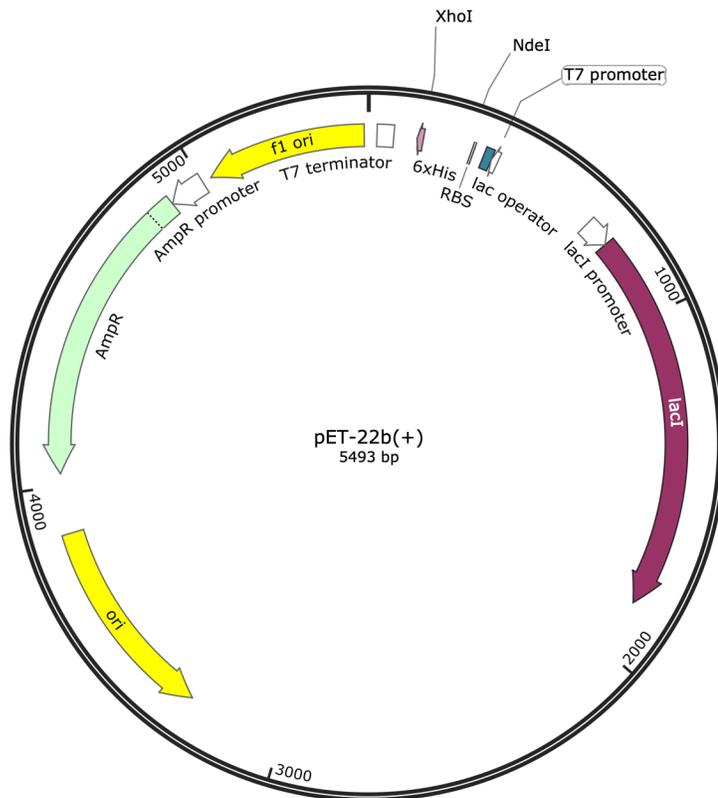


Figura 4. Esquema del plasmidio pET22b(+). En el mapa del plasmidio pET22b(+) se muestran los sitios de corte de las enzimas de restricción *NdeI* y *XhoI*, la resistencia a ampicilina y el promotor T7, y el sistema de represión del operón *lac*. Esquema extraído de SnapGene.

2.4. Obtención de secuencia y diseño de partidores.

La secuencia del gen *Strop_0315* de 1,026 pares de bases (pb), que codifica una L-asparaginasa II fue obtenida de la base de datos GeneBank (National Center for

Biotechnology Information, 2009). Se diseñaron los partidores AspSt_fw y AspSt_rv (Tabla III) de manera que fueran homólogos a las secuencias flanqueantes del gen *Strop_0315*, además de incluir en ellos sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción *NdeI* y *XhoI*, y así facilitar su posterior ligación al vector de expresión. Los partidores fueron sintetizados en *Integrated DNA Technologies Inc.*

Tabla III. Secuencia y características de los partidores AspSt_fw y AspSt_rv.

Partidores	Secuencia	Tamaño	Tm (°C)
AspSt_fw	5'GATACATATGGCGTTCCCGATCCCCTGGTTG 3'	31 pb	65.7°C
AspSt_rv	5'GATTATCTC GAGCCA GAG CGA CCG AAC GAG 3'	30 pb	65.7°C

2.5. Extracción de DNA genómico a partir de cultivos de *Salinisora tropica* CNB 440.

La cepa *Salinispora tropica* CNB 440, fue cultivada en 100 mL de medio MS1 SF2 a 28,5°C con una agitación de 200 rpm, durante 4 días hasta empezar la fase exponencial. Posteriormente las células fueron recolectadas y centrifugadas a 10,000 x g por 10 min a 4°C para separar las células del sobrenadante. La extracción de DNA se realizó con una adaptación del tratamiento de lisozima y extracción fenol-cloroformo-alcohol isoamílico del protocolo de Kieser et al., 2000. La concentración de DNA se cuantificó con MaestroNano (MaestroGen).

2.6. Amplificación del gen *Strop_0315* mediante PCR.

El gen que codifica la L-asparaginasa II fue amplificado mediante la reacción de PCR a partir del DNA genómico de *Salinispora tropica* CNB 440; a 10 ng de DNA genómico se agregaron 2.5 uL de los partidores AspSt_fw y AspSt_rv 10 uM, 0.5 uL de la enzima Phusion HF DNA polymerase (New England BioLabs.Inc), 1.5 ul DE DMSO (New England BioLabs.Inc), 10 uL de Buffer 5X (New England BioLabs.Inc), 1 uL dNTPs con 70% de contenido GC y 31.75 uL de agua estéril. Se realizó un gradiente de temperatura entre 51°C a 71.1°C, y luego de 53.65 °C a 57.1°C con el fin de determinar la temperatura óptima.

La temperatura elegida para las siguientes reacciones fue de 56.8°C. El ciclo de reacción para el PCR fue de 30 ciclos de 98°C por 10 s, 56.8°C por 20 s y 68°C por 30 s, además de una denaturación inicial de 98°C por 5 min y una extensión final a 72°C por 5 min.

2.7. Electroforesis en gel de agarosa.

Se realizó electroforesis en gel de agarosa de entre 1 a 2% para visualizar los resultados tanto de las reacciones de PCR, como de las purificaciones y digestiones posteriores. Para la elaboración del gel al 1% se diluyó 1 g de Agarosa (LE Agarose SeaKem ®) en 100 mL buffer TAE (4.84 g de Tris base, 1.148 mL de ácido acético glacial, 2 mL de EDTA 0.5 mM pH 8,0 para 1 L de solución) a los cuales se añadió 3uL de RedGel® (Biotium). Se cargaron en el gel 1 uL de la muestra con buffer de carga (30% glicerol, 0.25% azul de bromofenol) en porporción 5:1, además del marcador de peso molecular 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). La migración electroforética se llevó a cabo a 90 voltios por aproximadamente 1 h, para luego visualizar el resultado con luz ultravioleta.

2.8. Extracción y purificación de DNA desde gel de agarosa.

La extracción de DNA a partir del gel de agarosa se realizó cortando las bandas correspondientes al DNA de interés, con un bisturí estéril, a partir de las cuales se efectuó la purificación utilizando el kit GeneJet Gel Extraction® (Thermo Scientific) según las indicaciones del proveedor. La concentración de DNA se cuantificó con MaestroNano (MaestroGen).

2.9. Extracción y purificación del plásmido pET22b(+) a partir de *E. coli* BL21(DE3).

El vector de expresión pET22b(+) fue obtenido a partir de cultivos de 5 mL en medio LB a 37°C de la bacteria *E. coli* BL21(DE3), la cual lo contenía. La extracción del plásmido se llevó a cabo con el kit GeneJet Miniprep (Thermo Scientific) según las indicaciones del proveedor. La concentración de DNA plasmidial se cuantificó con MaestroNano (MaestroGen).

2.10. Digestión de DNA y plásmido pET22b(+) con enzimas de restricción.

El fragmento de DNA amplificado y previamente purificado fue digerido con las enzimas de restricción *NdeI* (New England BioLabs.Inc) y *XhoI* (Promega). Para 1 ug de DNA se agregó 1 uL de *NdeI* y *XhoI*, 2uL de BSA 10X y NEBuffer 10X (New England BioLabs.Inc) y el volumen restante en agua estéril hasta completar un volumen final de 20 uL. La mezcla se incubó por 2 h a 37°C y posteriormente las enzimas fueron inactivadas a 65°C por 20 min para detener la reacción. Se realizó el mismo protocolo para la digestión de 1 ug del plásmido pET22b(+).

2.11. Ligación entre el vector de expresión y el gen *Strop_0315* digeridos.

A partir del plásmido (96.07 ng/uL) y el fragmento de DNA (32.02 ng/uL) digeridos y purificados se generaron mezclas de ligación en proporciones 1:1 y 3:1 inserto-vector. Para las mezclas de ligación, se agregaron 5 uL de Buffer Rapid Ligation 2x (Invitrogen), 1 uL de T4 DNA Ligasa (Invitrogen), 1.04 uL del vector digerido, y 1.75 uL y 0.58 uL del inserto digerido para la proporción 3:1 y 1:1 respectivamente, además de agua estéril para completar un volumen de 10 uL. La mezcla se incubó a 25°C durante 2 h y luego se mantuvo a 4°C durante toda la noche.

2.12. Preparación de *E. coli* BL21(DE3) quimiocompetentes.

Para la preparación de células quimiocompetentes se realizó un preinóculo de 4 mL de *E. coli* BL21(DE3) en medio LB a 37°C durante la noche. Al día siguiente se midió la densidad óptica del cultivo a 600 nm (DO600) para determinar la concentración celular y calcular el volumen del inóculo para partir con una DO600 de 0.05 en un volumen de 100 mL de medio LB. Posteriormente las células se cultivaron a 37°C por aproximadamente 3 h hasta alcanzar una DO600 de 0.3. Luego se centrifugó el cultivo por 10 min a 5,000 x g y 4°C para separar el sobrenadante del pellet celular, el cual luego se resuspendió en 25 mL de MgCl₂ 0.1M. La solución se centrifugó nuevamente y el pellet celular se resuspendió en 2 mL de una solución de 85% v/v de CaCl₂ 0.1 M y se distribuyeron en alícuotas de 100 uL para conservarlas a -80°C. Todo el procedimiento se realizó en hielo.

2.13. Transformación de *E. coli* BL21(DE3) quimiocompetentes.

Para la transformación de células de *E. coli* BL21(DE3) quimiocompetentes se agregaron 2 uL de la mezcla de ligación, o de plásmidos purificados con el kit GeneJet Miniprep, a

100 uL de células, se mantuvo 20 min en hielo para luego dar un pulso de 42°C por 1 min en el Thermo-Shaker. Con la mezcla en hielo se agregaron 900 uL de medio LB y se incubaron por 1 h a 37°C. Posteriormente se centrifugó la solución a 13,000 rpm por 1 min, se sembró el sedimento celular resuspendido en LB agar con antibiótico (ampicilina a 100 mg/mL (Winkler) y/o cloranfenicol a 100 mg/mL (Merck), según corresponda) y se cultivó por 12 h a 37°C. Posteriormente se seleccionaron las colonias aisladas y se cultivaron toda la noche en medio LB con antibiótico a 37°C. Cada clon se almacenó en glicerol al 20% a -80°C.

2.14. Inducción de proteína recombinante en *E. coli* BL21(DE3) con IPTG.

Para la inducción de la proteína recombinante a partir de células de *E. coli* BL21(DE3) transformadas se dejó creciendo un preinóculo en 4 mL de medio LB con antibiótico durante toda la noche a 37°C. Luego se midió la densidad óptica a 600 nm y se calculó el volumen del preinóculo para tener una concentración de DO600 de 0,05 en el volumen requerido de cultivo, en este caso se utilizaron para las distintas pruebas volúmenes de 25, 50 y 100 mL. Posteriormente se cultivaron las células a distintas temperaturas a 200 rpm hasta alcanzar una DO600 de 0.6, momento en que se agregó IPTG a una concentración variable; durante los experimentos se probaron concentraciones desde 0.1 mM hasta 1 M, con el fin de determinar la mejor condición para la producción de la proteína en forma soluble. Las células se cultivaron hasta alcanzar una DO600 sobre 2.0, luego se centrifugaron por 10 min a 5,000 x g y 4°C para separar las células del sobrenadante y finalmente se analizaron las fracciones celulares. En la producción de la proteína se probaron distintas condiciones, entre ellas la variación de la concentración del inductor, la temperatura de inducción (18, 25 y 37°C) y el medio de cultivo (medio LB

y TB). Además todos los ensayos contaron con un control correspondiente a *E. coli* BL21(DE3) transformado con el vector pET22b(+) sin el inserto, tratado bajo las mismas condiciones.

2.15. Inducción de proteína recombinante en *E. coli* BL21(DE3) en medio autoinducible.

Otra forma de inducción de la proteína recombinante a partir de células de *E. coli* BL21(DE3) transformadas se realizó utilizando medio autoinducible (AIM). Para ello se dejó creciendo un preinóculo en 4 mL de medio LB con antibiótico durante toda la noche a 37°C. Luego se midió la densidad óptica a 600 nm y se calculó el volumen del preinóculo para tener una concentración de DO600 de 0.05 en 50 mL de medio AIM. Se cultivaron las células a 200 rpm hasta alcanzar una DO600 sobre 2.0, se centrifugaron por 10 min a 5,000 x g y 4°C para separar las células del sobrenadante y finalmente analizaron las fracciones celulares. En este caso se probó la inducción a 18 y 25 °C. Además todos los ensayos contaron con un control que corresponde a *E. coli* BL21(DE3) transformado con el vector pET22b(+) sin el inserto, tratado bajo las mismas condiciones.

2.16. Análisis de fracciones celulares.

El análisis de las fracciones celulares consiste en separar las células del sobrenadante, luego lisarlas y separar las fracciones celulares con el fin de estudiar la producción de la proteína recombinante. Para ello las células centrifugadas se resuspendieron en Binding buffer 1x (Tris 40 mM, Cloruro de sodio 500 mM, Imidazol 5 mM), se rompieron por sonicación colocadas en hielo, con el Microson Ultrasonic Cell Disruptor™ (Misonic), con 6 sesiones de 6 pulsos de 10 s cada uno. Una vez lisadas se tomó una muestra de la

proteína total para posteriores análisis y el resto se centrifugó por 10 min a 10,000 x g y 4°C. Se recuperó el sobrenadante correspondiente a la fracción soluble del lisado celular. Posteriormente el sedimento celular sobrante se resuspendió en Binding buffer denaturante 1x (Tris 40 mM, Cloruro de sodio 500 mM, Imidazol 5 mM, Urea 8 M), y se volvió a centrifugar por 10 min a 10,000 x g y 4°C. El sobrenadante que fue recuperado corresponde a la fracción insoluble del lisado celular solubilizada con urea. Todas las fracciones posteriormente fueron analizadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico.

2.17. Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS PAGE).

La electroforesis SDS PAGE se realizó en Mini-PROTEAN® Tetra System (Bio Rad). Se elaboraron geles de poliacrilamida al 12.5% los cuales se conforman por un gel de resolución (1.58 mL de de Acrilamida-Bisacrilamida 29:1, 0.95 mL de buffer Tris 1.5 M pH 8.8 con 0,4% SDS, 0.27 mL de agua destilada, 1 mL de glicerol al 40%, 2 uL de Temed y 20 uL de PSA al 10%) y un gel concentrador (0.168 mL Acrilamida-Bisacrilamida 29:1, 0.25 mL de buffer tris 0.5 M pH 6.8 con 0.4% SDS, 0.575 mL de agua destilada, 1.25 uL de Temed y 7.5 uL de PSA al 10%). La migración electroforética se llevó a cabo en buffer de corrida (3 g de Tris, 14.4 g de Glicina, 1 g de SDS para 1 L de solución) a 200 voltios por aproximadamente 1 h. El resultado fue revelado con una solución de tinción por 2 h (1 g de azul de coomassie, 450 mL de metanol, 100 mL de ácido acético glacial), seguida de una solución de destinción por 1 h (40% metanol, 10% de ácido acético).

2.18. Tinción de geles de poliacrilamida con nitrato de plata.

Una vez realizado el SDS-PAGE, se incubó el gel durante 1 h con solución de fijación (40% etanol, 10% ácido acético). Una vez transcurrido el tiempo se lavó con agua destilada varias veces durante 1 h, o se remojó en agua toda la noche. Luego se eliminó el agua y se incubó el gel con DTT a 0.005 mg/mL por 30 min. Se eliminó el reactivo de DTT sin enjuagar y se añadió una solución de nitrato de plata 1mg/mL por 30 min en oscuridad. Se eliminó la solución, para agregar una solución de carbonato de sodio 36 mg/mL con 0.06% de formaldehído al 37%. Se verificó la aparición de bandas, entre 2 y 10 min, y se detuvo la reacción con ácido cítrico (3 g de ácido cítrico por cada 125 mL de solución).

2.19. Western Blot.

El western blot fue realizado con el SuperSignal West HisProbe Kit (ThermoScientific), según las indicaciones del proveedor. A partir de una electroforesis en gel de poliacrilamida al 12.5 %, se extrajo el gel y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa mediante electrotransferencia a 100V por 1 h. Posteriormente la membrana se bloqueó con 10 mL de BSA/TBST por 1 h a temperatura ambiente y se lavó dos veces con 15 mL de TBST. Luego la membrana fue incubada con 10 mL con la sonda HisProbe-HPR por 1 h con agitación. Se lavó cuatro veces con 15 mL de TBST e incubó con 7.5 mL del sustrato SuperSignal West Pico por 5 min. Finalmente se removió el exceso de líquido y la membrana se reveló con el escáner de quimioluminiscencia (C-DiGit® Blot Scanner).

2.20. Cromatografía de afinidad Ni-NTA en columna PD10.

Una vez separadas las fracciones celulares se realizó la purificación de la proteína recombinante mediante cromatografía de afinidad Ni-NTA en columnas PD10 con resina

de agarosa Ni-NTA (Thermo Scientific). Inicialmente se ambientó la columna con 5 volúmenes de Binding buffer 1x, luego se cargó la columna con la fracción soluble del lisado celular y se colectaron las muestras eluidas (muestras de la Fracción F1), después de agregaron 5 volúmenes de Binding buffer 1x y se colectaron las muestras de la elución (Fracción F2). Posteriormente se lavó la columna con 5 volúmenes de Wash buffer 1x (Tris 40 mM, Cloruro de sodio 500 mM, Imidazol 16 mM), se colectaron las muestras (Fracción F3) y finalmente se agregaron 5 volúmenes de Elute buffer 1x (Tris 40 mM, Cloruro de sodio 500 mM, Imidazol 300 mM), con el cual eluyeron las proteínas con alta afinidad a la resina que corresponden a la fracción de elución F4.

Para realizar cromatografía con la fracción celular insoluble, se siguió el mismo procedimiento, pero con Binding buffer denaturante 1x, Wash buffer denaturante 1x (Tris 40 mM, Cloruro de sodio 500 mM, Imidazol 16 mM, urea 8 M) y Elute buffer denaturante 1x (Tris 40 mM, Cloruro de sodio 500 mM, Imidazol 300 mM, urea 8 M). Las fracciones de elución fueron analizadas posteriormente con electroforesis SDS PAGE.

2.21. Cromatografía Ni-NTA en batch.

Al lisado celular se agregó 100 uL de resina Ni-NTA y se dejó agitando por 1 h a 4°C. Posteriormente la mezcla se eluyó por una columna PD10 con filtro y se colectó una muestra de elución (Fracción F1); luego la resina que quedó en la columna se lavó con 5 volúmenes de Binding buffer 1x, Wash buffer 1x y Elute buffer 1x. Se colectaron las muestras de elución de cada fracción (Fracciones F2, F3 y F4 respectivamente) y se analizaron posteriormente con electroforesis SDS PAGE.

2.22. Ensayo cualitativo de actividad asparaginasa con rojo fenol.

Se determinó si los cultivos transformados, con el vector pET22b(+) con el inserto del gen *Strop_0315*, estaban expresando la L-asparaginasa mediante un ensayo colorimétrico con rojo fenol. Para ello se indujo la expresión de la proteína L-asparaginasa II recombinante en *E. coli* BL21(DE3) y de su control, sin el inserto que codifica a la enzima, en 50 mL de medio AIM a 25°C. Posteriormente se agregó 2 mL de cultivo a 2 mL de buffer fosfato 20 mM pH 8.0 (94.7 mL de fosfato disódico y 5.3 mL de bifosfato de sodio para 100 mL de solución), con L-asparagina (Sigma) 10 mM y rojo fenol (Sigma) al 0.001% y se incubó a temperatura ambiente durante 4 días. Se determinó la presencia de L-asparaginasa mediante el cambio de coloración del medio de amarillo a rosado debido al cambio de pH lo que indica un resultado positivo. El mismo procedimiento fue realizado para el cultivo control.

2.23. Ensayo cuantitativo de actividad asparaginasa y glutaminasa con reactivo de Nessler.

A 50 uL de lisado celular o proteína purificada se agregaron 200 uL de sustrato, L-asparagina o L-glutamina 40 mM, en tris 50 mM pH 8.6 y se incubó a 37°C por 30, 20 y 10 min. Se detuvo la reacción con 50 uL de TCA 1.5 M y se centrifugaron las muestras a 12,000 rpm por 10 min; se colectaron 200 uL del sobrenadante los que se diluyeron en 3.7 mL de agua destilada y se agregó 100 uL del reactivo de Nessler (Merck). Se incubaron las muestras por 10 min a temperatura ambiente y se midió la DO a 450 nm en el espectrofotómetro.

Se optimizó el protocolo para el ensayo en una placa de 96 pocillos, una vez que se centrifugaron las muestras a 12,000 rpm por 10 min, se colectaron 200 uL del sobrenadante a los que se agregaron 20 uL de reactivo de Nessler. Se incubaron las

muestras por 10 min a temperatura ambiente y se midió la DO a 450 nm en el lector de placas Asys UVM 340 (Biochrom) con el software Microplate Instrumentation Control Copyright© 2008 Dan Kittrich.

Para estimar la cantidad de amonio liberado en reacción, se realizó una curva de calibración con sulfato de amonio de entre 0 y 40 mM, bajo las mismas condiciones utilizadas para la medición de las muestras.

2.24. Cuantificación de proteína mediante método de Bradford.

Para la cuantificación de la cantidad de proteína en una muestra a 50 uL de muestra se agregan 1.2 mL de agua destilada y 0.5 mL de reactivo de Bradford (Biorad). Además, se realiza una curva de calibración a partir de un stock de 2 mg/mL de BSA, se realizan diluciones seriadas de entre 0 y 1 mg/mL, se toman 50 uL de cada dilución y se agregan a 1.2 mL de agua destilada y 0.5 mL de reactivo de Bradford. Las muestras se miden a DO 596 y DO 465 en el espectrofotómetro, y posteriormente se calcula la razón entre ellas.

2.25. Programas computacionales utilizados.

Los gráficos y análisis estadísticos fueron realizados con el programa GraphPad Prism 7. El procesamiento de imágenes digitales de geles de poliacrilamida se realizó con el programa Image J. La visualización de los modelos de estructura tridimensional de proteínas se llevó a cabo con el programa PyMOL.

3. RESULTADOS

3.1. Obtención del gen que codifica la enzima L-asparaginasa II a partir de cultivos de *Salinispora tropica* CNB 440.

Se extrajo el DNA genómico de *Salinispora tropica* CNB 440 mediante una adaptación del tratamiento de lisozima y extracción fenol-cloroformo-alcohol isoamílico del protocolo de Kieser et al., 2000. Se obtuvo el DNA genómico en una concentración de 237.09 ug/uL.

La secuencia que codifica la L-asparaginasa II fue conseguida de la base de datos GeneBank. A partir de ella se diseñaron los partidores AspSt_fw y AspSt_rv con los que se amplificó el gen mediante PCR, en un gradiente amplio de temperatura de entre 51 y 68.2°C. Se logró amplificar correctamente el gen a una temperatura de 55.5°C (Figura 5).

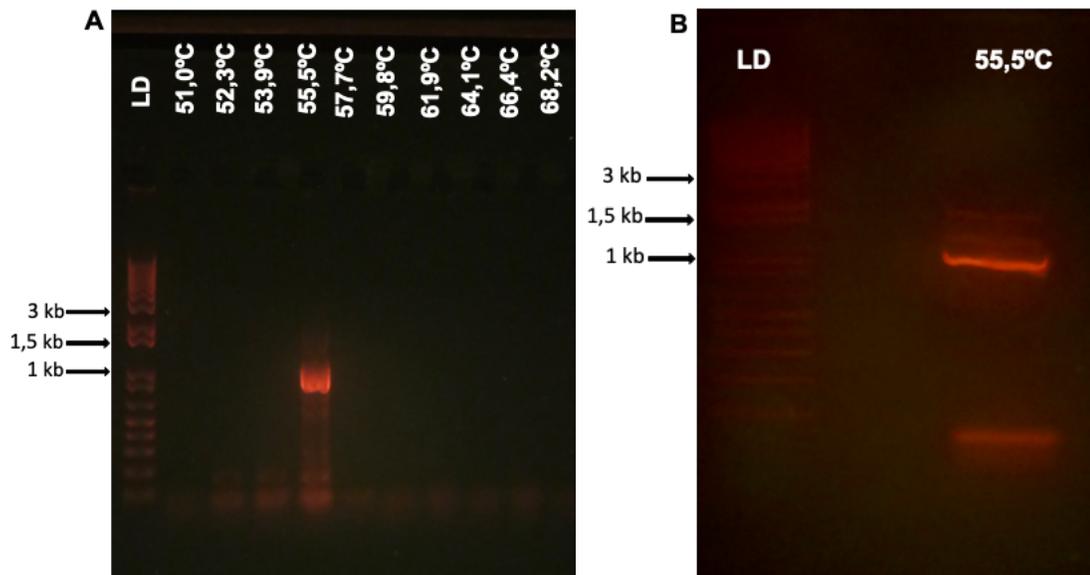


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de la amplificación del gen *Strop_0315* con los partidores AspSt_fw y AspSt_rv. A. Electroforesis en gel de

agarosa al 1% de la amplificación del gen *Strop_0315* en un gradiente de temperatura de 51 a 68.2°C. B. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de la amplificación del gen a 55.5°C. Las flechas negras indican las bandas de 3, 1.5 y 1 Kb del marcador de peso 1Kb plus DNA ladder (LD).

Posteriormente se realizó PCR en un gradiente de temperaturas acotado a 55.5°C, entre 53.65 a 57.1°C. La temperatura seleccionada, a la que se observó menos amplificaciones inespecíficas en comparación a la amplificación realizada a 55.5°C (Figura 5B), fue de 56.8°C (Figura 6B).

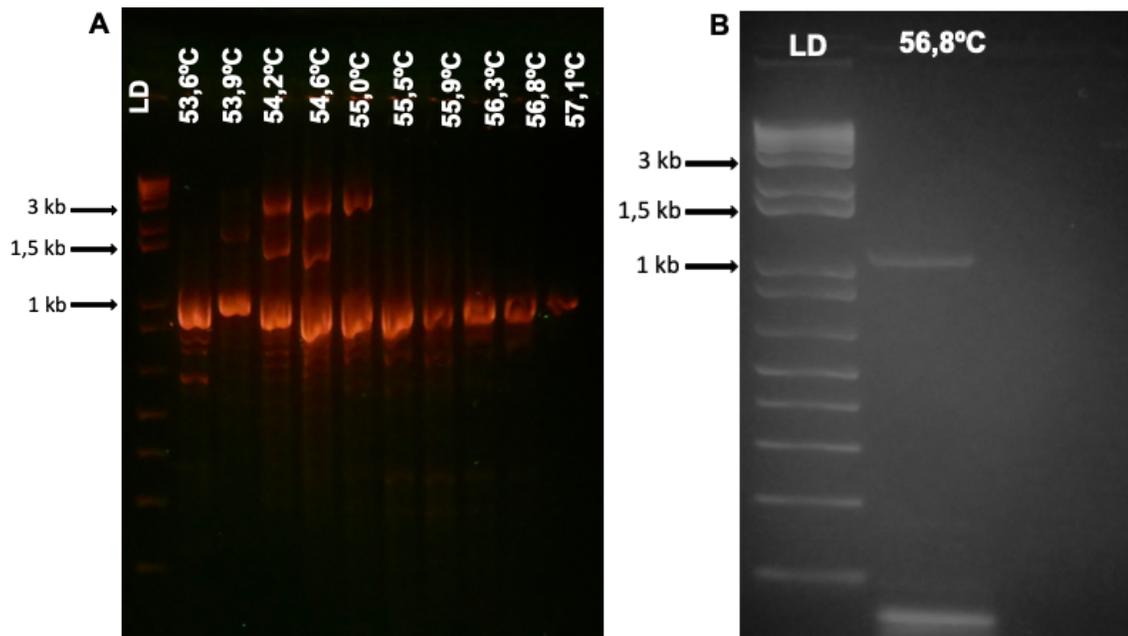


Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa de la amplificación del gen *Strop_0315* en gradiente acotado de temperatura. A. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de la amplificación del gen en un gradiente acotado de temperatura, de los 53.6 a 57.1 °C. B. Electroforesis en gel de agarosa al 2% del resultado de la amplificación a 56.8°C. Las flechas negras indican las bandas de 3, 1.5 y 1 Kb del marcador de peso 1Kb plus DNA ladder (LD).

3.2. Clonación del gen de L-asparaginasa II proveniente de *Salinispora tropica* CNB440 en *Escherichia coli* BL21(DE3).

El gen amplificado fue posteriormente purificado desde el gel y digerido con las enzimas de restricción *NdeI* y *XhoI* (Figura 7A). Por otro lado, el vector de expresión pET22b(+) fue obtenido de cultivos de *E. coli* BL21(DE3), que lo tenían incorporado, mediante extracción de DNA plasmidial mediante miniprep, para luego digerirlo con las enzimas de restricción *NdeI* y *XhoI*. A través de electroforesis en gel de agarosa se comprobó la escisión del plásmido (Figura 7B).

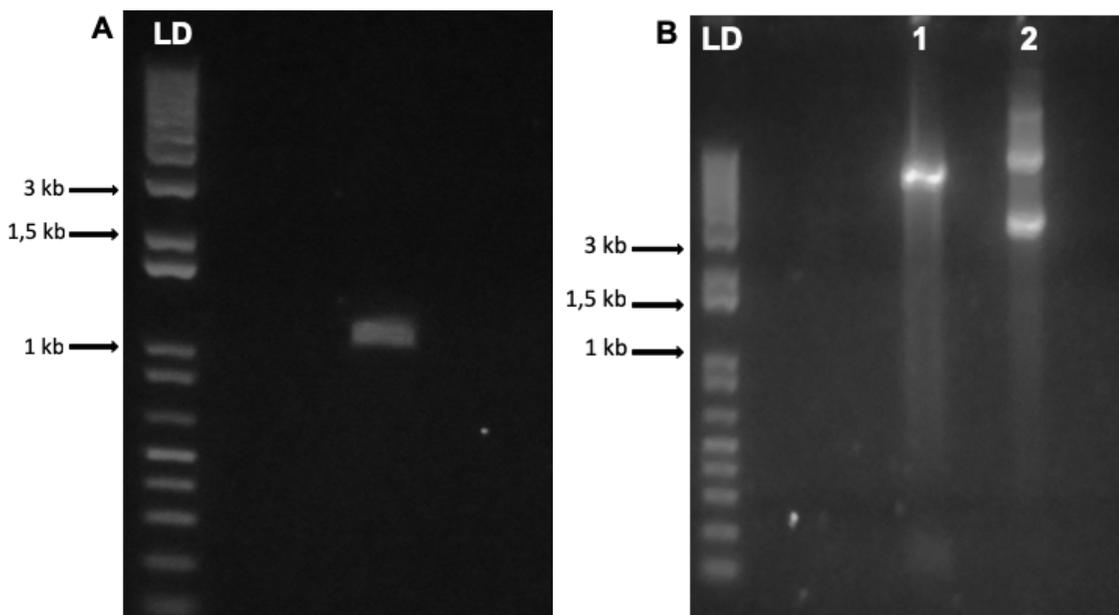


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del gen *Strop_0315* purificado y el vector pET22b(+), digeridos con las enzimas de restricción *NdeI* y *XhoI*. A. Electroforesis del gen *Strop_0315* purificado y digerido con *NdeI* y *XhoI*. B. Electroforesis en gel de agarosa de 1) Vector pET22b(+) sin digerir. 2) Vector pET22b(+) digerido con las enzimas de restricción *NdeI* y *XhoI*. Las flechas negras indican las bandas de 3, 1.5 y 1 Kb del marcador de peso 1Kb plus DNA ladder (LD).

Una vez digeridos tanto el vector como el gen, con el propósito de construir el vector pET22b(+)-ASPII, se realizó una mezcla de ligación a diferentes proporciones inserto-vector, de 1:1 y 1:3, más un control solo con el vector digerido. Se obtuvo una colonia transformante en la mezcla de ligación 1:3 (Figura 8C).

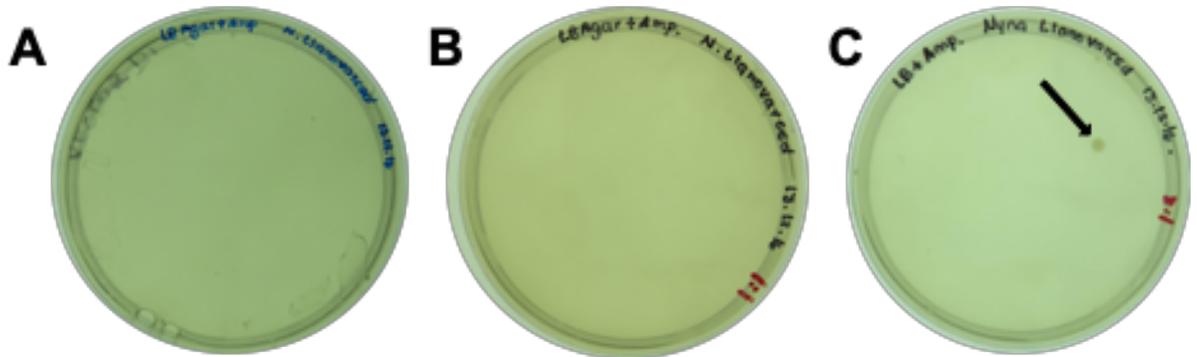


Figura 8. Cultivos de *E. coli* BL21(DE3) transformadas con mezclas de ligación de pET22b(+) con inserto. A. Cultivo control, con vector digerido. B. Cultivo de BL21(DE3) transformado con mezcla de ligación 1:1 vector-inserto. C. Cultivo de BL21(DE3) transformado con mezcla de ligación 1:3 vector-inserto.

Con el fin de corroborar que la bacteria transformante posee el vector con el inserto integrado se realizó un cultivo de la colonia transformante en medio LB con ampicilina, se extrajo el DNA plasmidial mediante miniprep y digirió el plásmido con las enzimas de restricción *NdeI* y *XhoI*. Se realizó electroforesis en gel de agarosa al 1% para corroborar el resultado de la transformación (Figura 9), el cual fue positivo observándose inserto en el peso esperado para el gel *Strop_0315*. Se secuenció el vector incorporado en células de *E. coli* transformadas y se corroboró la correcta inserción del gen que codifica la L-asparaginasa II.

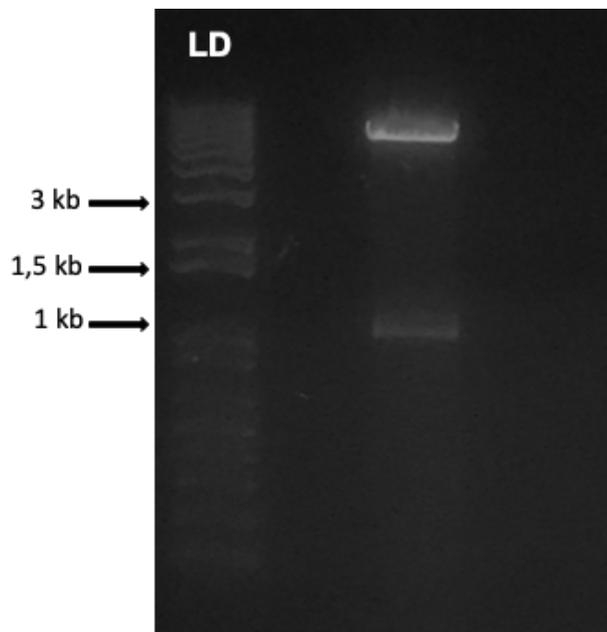


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del producto de la digestión del plásmido obtenido desde cepa *E. coli* BL21(DE3) transformante. La primera banda corresponde al fragmento del vector escindido y la segunda al fragmento de 1,000 pb, el peso esperado para el gen *Strop_0315*. Las flechas negras indican las bandas de 3, 1.5 y 1 Kb del marcador de peso 1Kb plus DNA ladder (LD).

3.3. Expresión del gen que codifica la enzima L-asparaginasa II en *E. coli* BL21(DE3).

Una vez corroborada la inserción correcta del gen y su transformación en cepas de *E. coli* BL21(DE3), se realizó la inducción del gen que codifica la proteína recombinante con 0.3 mM de IPTG en medio LB a 37°C. Una vez finalizada la inducción, las células fueron colectadas y luego lisadas mediante sonicación. Se separaron las fracciones celulares para su posterior análisis y visualización con SDS PAGE al 12.5%.

La secuencia aminoacídica de la proteína indica un peso aproximado de 35.2 kDa. En el análisis de las fracciones celulares se observó la proteína de interés en la fracción insoluble cercana a la banda de 34 kDa del marcador de peso molecular. Para los siguientes experimentos se utilizó como cultivo control la cepa *Escherichia coli* BL21(DE3) transformada con el vector de expresión pET22b(+) vacío, es decir sin la inserción del gen que codifica la L-Asparaginasa II.

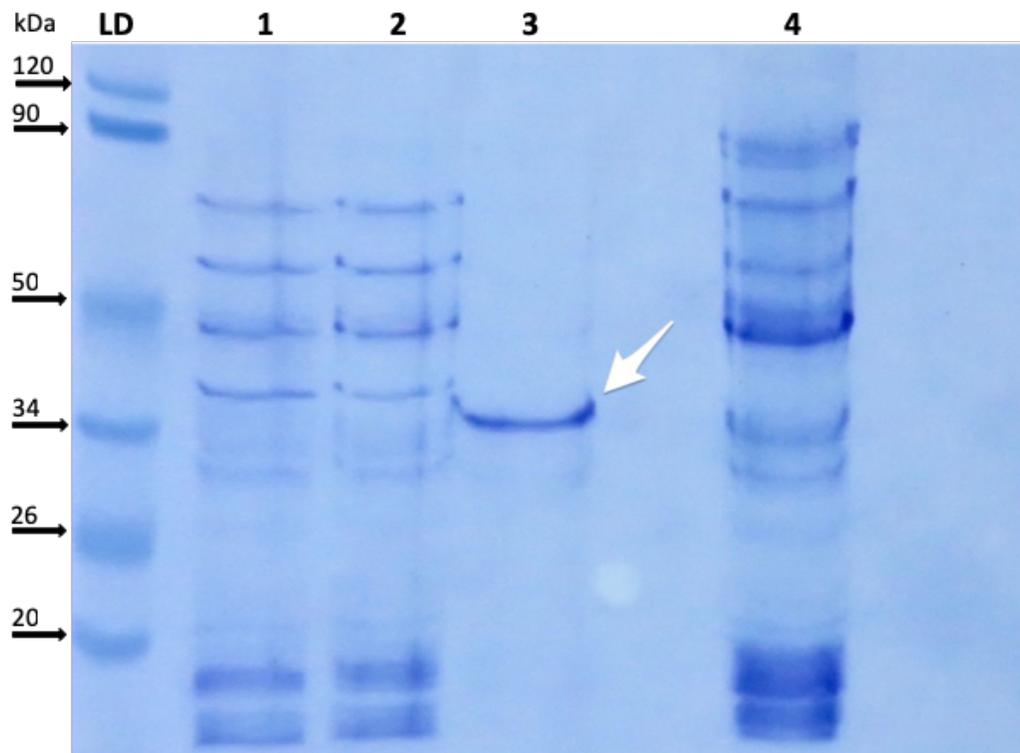


Figura 10. Análisis de fracciones celulares con SDS PAGE de células *E. coli* BL21(DE3) transformadas con el vector pET22b(+)-ASPII. La flecha blanca indica la banda de la proteína esperada. En el carril 1 se observa el perfil proteico de la proteína total, en el carril 2 y 3 la fracción de proteína soluble e insoluble respectivamente. En el carril 4 el sobrenadante. Las flechas negras indican los pesos del marcador de peso molecular (LD) Thermo Scientific Prestained Protein Molecular Weight Marker.

Para corroborar que la proteína observada en la fracción insoluble (Figura 10) corresponde a la L-asparaginasa II recombinante, se realizó cromatografía de afinidad Ni-NTA, donde se purificaron las fracciones solubles e insolubles del lisado celular (Figura 11). Se recuperaron cuatro fracciones de la cromatografía de afinidad por cada muestra: la primera fracción de elución, F1, corresponde a la proteína no unida; la fracción F2, corresponde a las muestras eluidas de la columna lavada con binding buffer, el cual posee una baja concentración de imidazol para eliminar las proteínas débilmente unidas a la matriz. La fracción F3 corresponde a las muestras eluidas con el buffer de lavado, que posee una mayor concentración de imidazol y finalmente la fracción F4 corresponde a las muestras obtenidas del último lavado de la columna con el buffer de elución, el cual tiene una alta concentración de imidazol y donde se espera encontrar la proteína recombinante.

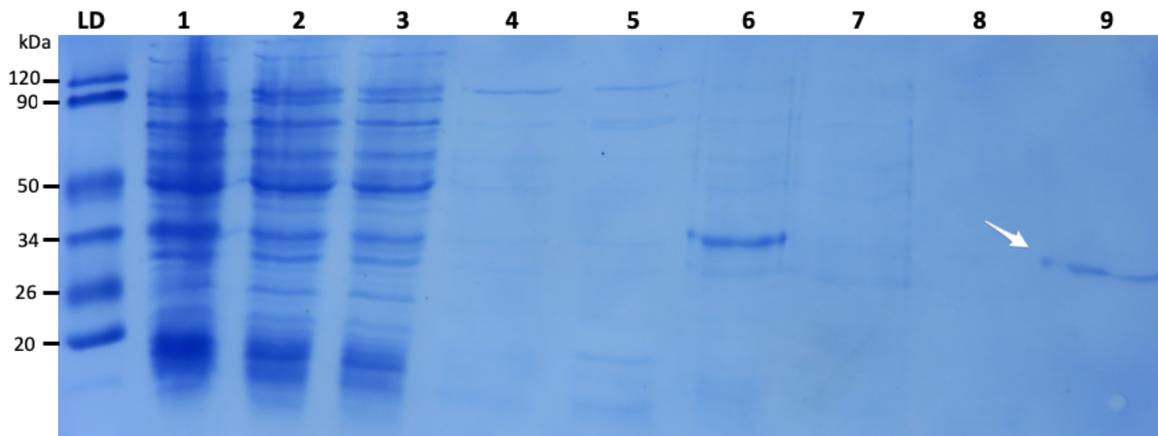


Figura 11. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12,5% de fracciones obtenidas de la purificación de la proteína recombinante mediante cromatografía de afinidad Ni-NTA. En la figura se observa la electroforesis de las muestras de proteína total (carril 1), proteína soluble (carril 2), las fracciones de elución, P.S F1, F3 y F4, de la purificación de la proteína soluble en los carriles 3, 4 y 5 respectivamente, obtenidas a partir de

fracciones celulares de cultivos inducidos a 37°C con 0,3 mM de IPTG. También se observan la muestra de la proteína insoluble (carril 6) y las fracciones de elución de la fracción insoluble P.I F1, F3 y F4 en los carriles 7, 8 y 9 respectivamente. A la izquierda de la figura se indican los pesos del marcador de peso molecular Thermo Scientific Prestained Protein Molecular Weight Marker (LD) y la flecha blanca indica la proteína recombinante purificada en la fracción de elución F4 de la muestra de proteína insoluble.

En la imagen se observa la proteína recombinante en la fracción de elución F4 de la muestra de proteína insoluble, a la altura de la banda de 34 KDa del marcador de peso molecular; en base a ello se corroboró que la proteína recombinante se está produciendo, pero como agregado proteico. Posteriormente se realizaron inducciones a 37°C a diferentes concentraciones de IPTG (0.2, 0.5 y 1 mM), obteniendo en todos los casos expresión de la proteína como agregado proteico en la fracción insoluble (Figura 12). En consecuencia, los posteriores experimentos tienen como objetivo la expresión de la proteína en su forma soluble.

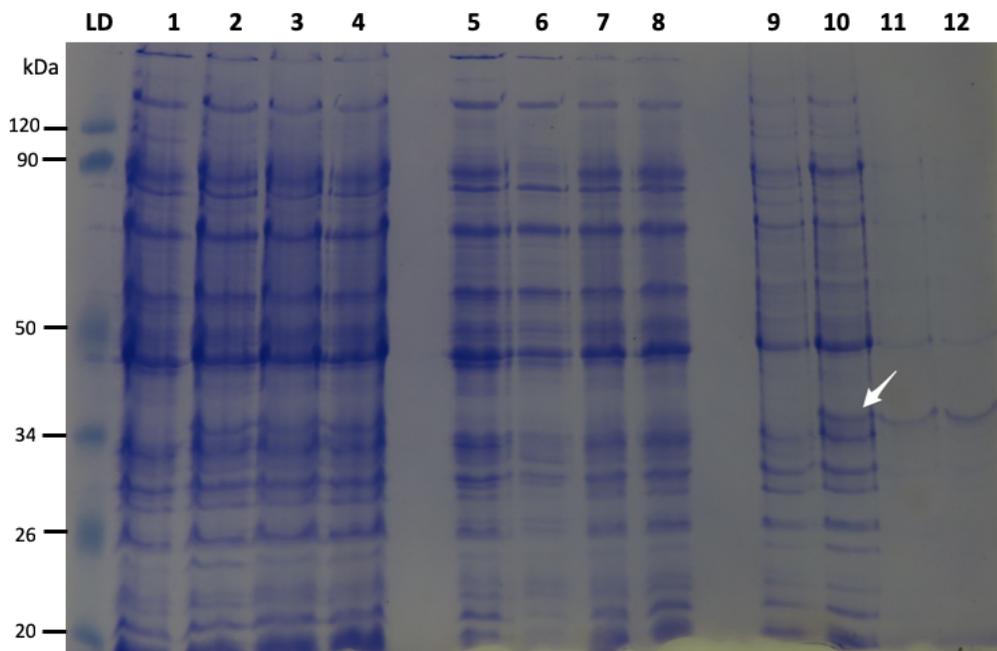


Figura 12. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12,5% de fracciones celulares de cultivos inducidos a 37°C con diferentes concentraciones de IPTG. En la imagen se observan el perfil proteico de la proteína total del control, transformado con el vector sin el inserto (carril 1), y de las inducciones con 0.2, 0.5, y 1 mM de IPTG (carril 2, 3 y 4, respectivamente). Además, se indican las fracciones de proteína soluble del control, y de las inducciones con 0.2, 0.5, y 1 mM de IPTG (carril 5, 6, 7 y 8, respectivamente). Las fracciones de proteína insoluble del control, y de las inducciones con 0.2, 0.5, y 1 mM de IPTG corresponden a los carriles 9, 10, 11 y 12, respectivamente. Todas las inducciones se realizaron a 37°C. La flecha blanca indica la banda de la proteína esperada cercana a los 35 kDa, en la fracción insoluble. A la izquierda de la figura se indican los pesos del marcador de peso molecular Thermo Scientific Prestained Protein Molecular Weight Marker (LD).

Otro problema observado fue el bajo crecimiento celular en medio LB, se probaron dos medios de cultivo más nutritivos, el medio Terrific Broth (TB), al cual también se agrega IPTG para la inducción del gen que codifica la proteína recombinante; y el medio de autoinducción (AIM) que posee lactosa, disacárido que induce el promotor T7, al igual que el reactivo IPTG. Se realizaron cultivos bajo las mismas condiciones utilizadas en medio LB a 37°C, y se obtuvo un aumento de la densidad celular después de 7 h de cultivo, produciéndose mayor cantidad de la proteína recombinante de forma insoluble, por lo que finalmente se utilizaran estos medios para los experimentos posteriores.

Se realizaron cultivos de cepas BL21(DE3) transformadas con el vector pET22b(+)-ASPII con medio TB y AIM a 25°C y 18°C, ambos inducidos con 0.3 mM de IPTG, con el objetivo de producir la proteína recombinante de forma soluble. En ambos casos se observó producción de proteína en la fracción insoluble (Anexo 1 y 2). En base a los

resultados anteriores se evaluó la expresión basal a 37°C, es decir, la expresión de la proteína sin agregar IPTG al medio de cultivo, con el fin de corroborar si la proteína recombinante se estaba produciendo sin la presencia del inductor.

Los resultados demostraron que la proteína recombinante estaba siendo producida como agregado insoluble (Figura 13A) sin inductor del promotor T7 presente en el medio, sea este IPTG o lactosa, por lo que no es posible regular la inducción con precisión y producir la proteína en su estado soluble en la cepa construida.

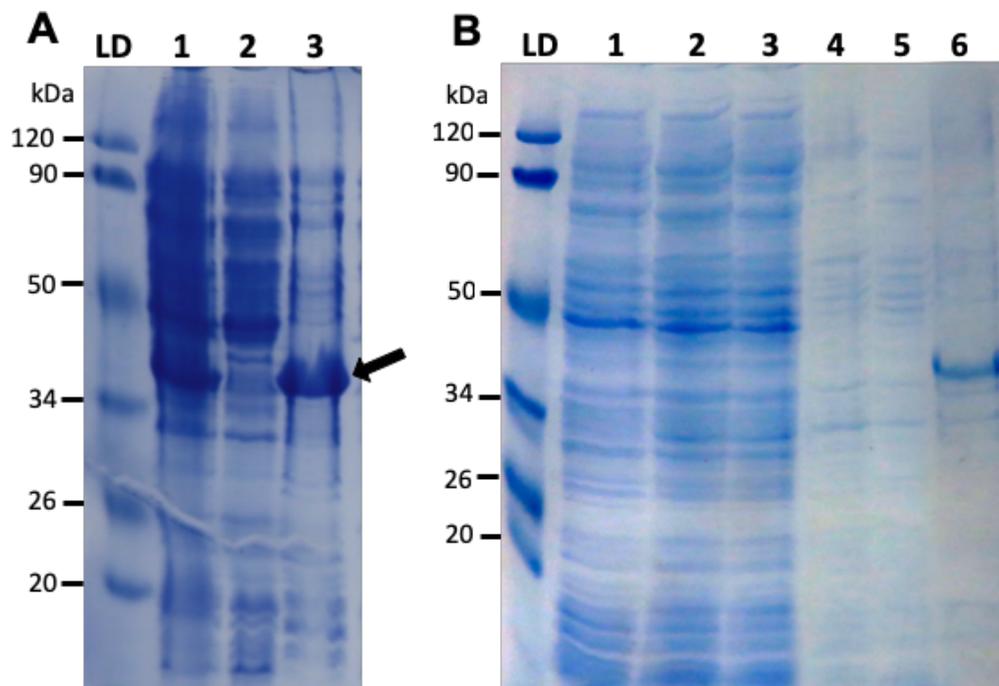


Figura 13. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12,5% de fracción celular soluble e insoluble de *E. coli* BL21(DE3)-ASPII (A) y *E. coli* BL21(DE3)-ASPII/pLysS (B), cultivadas a 37°C sin inductor. En la imagen 13.A se observa el perfil proteico de la fracción de proteína total (carril 1), de proteína soluble (carril 2) e insoluble (Carril 3), para la inducción basal realizada a 37°C sin agregar inductor. La flecha negra indica la expresión de la proteína recombinante en la fracción insoluble del perfil proteico. En la

imagen 13.B se observa el perfil proteico de las de las inducciones realizadas a 37°C de las células co-transformadas con los vectores pET22b(+)-ASPII y pLysS, entre ellas la fracción de proteína soluble del control (carril 1), de la inducción basal (carril 2), de la realizada con 0,1 mM de IPTG (carril 3). Además, se observa el perfil proteico de la fracción de proteína insoluble del control (carril 4) y de la inducción basal (carril 5). El carril 6 corresponde a una muestra de proteína insoluble de cultivos de *E. coli* BL21(DE3)-ASPII, con la proteína agregada. A la izquierda de la figura se indican los pesos del marcador de peso molecular Thermo Scientific Prestained Protein Molecular Weight Marker (LD).

Con el fin de controlar la inducción basal de la expresión de la proteína recombinante, bajo el control del promotor T7, las cepas fueron co-transformadas con los vectores pET22b(+)-ASPII y pLysS. El vector pLysS deriva de pACYC184 que codifica la lisozima T7, un inhibidor de la T7 RNA polimerasa, el cual fue extraído de cepas de *E. coli* BL21 (DE3) que lo tenían incorporado. Las colonias transformantes fueron seleccionadas con ampicilina y cloranfenicol (Figura 14). Finalmente se realizó PCR de colonias para comprobar la presencia de inserto codificante de la L-asparaginasa II en las colonias transformantes. Se cultivó *E. coli* BL21 (DE3) co-transformada a 37°C en medio TB, y se comprobó mediante electroforesis que ya no existe inducción basal (Figura 13B).

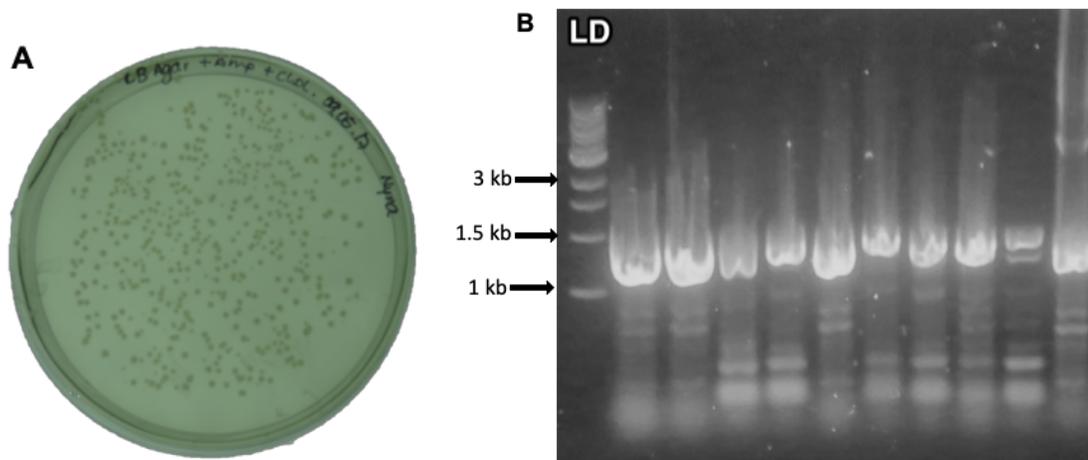


Figura 14. Cultivo de *E. coli* BL21 (DE3) en LB agar, transformado con los vectores pET22b(+)-ASPII y pLysS (izquierda) y PCR de colonias (derecha). A. Colonias transformantes que crecieron a 37°C en una placa de LB agar suplementado con ampicilina y cloranfenicol. B. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de la amplificación del gen *Strop_0315* de diez colonias extraídas de la placa de cultivo, lo que corrobora la presencia del inserto que codifica la proteína recombinante. Las flechas negras indican las bandas de 3, 1.5 y 1 Kb del marcador de peso 1 Kb DNA Ladder (LD).

Posteriormente se indujo la expresión del gen que codifica la proteína recombinante en cultivos a 18°C (Figura 15) con 0.1, 0.2 y 0.3 mM de IPTG, donde se observaron tenues bandas a la altura esperada, sin ser posible aseverar si corresponden a la proteína recombinante. También se realizó inducción de cultivos a 25°C con 0.1, 0.2, y 0.3 mM de IPTG; en este caso fue posible observar bandas en la fracción soluble de los cultivos realizados a 25°C (Figura 15), de aproximadamente 35 kDa, donde se ve diferencia en el patrón de bandas con respecto al control, por lo que se infiere que existe producción de la proteína recombinante de forma soluble en pequeñas cantidades.

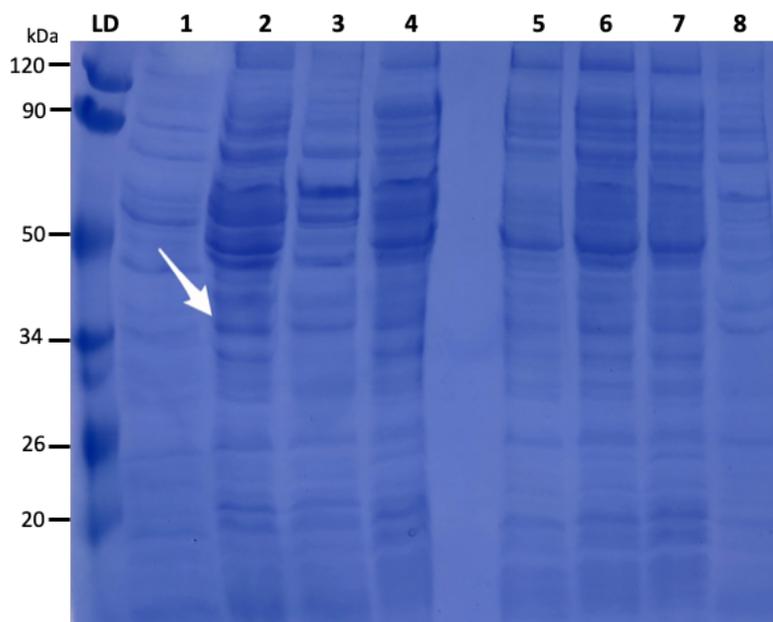


Figura 15. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12,5 % del extracto proteico soluble obtenido de cultivos inducidos a 25°C con distintas concentraciones de IPTG. En la imagen se observa el perfil proteico de las fracciones de proteína soluble para las inducciones realizadas a 25°C y 18°C con diferentes concentraciones de IPTG, más sus respectivos controles. El carril 1 corresponde a la fracción de proteína soluble del cultivo control a 25°C. Los carriles 2, 3 y 4 corresponden a la fracción de proteína soluble obtenida de cultivos de *E. coli* BL21(DE3)-ASPII/pLysS inducidos a 25°C con 0.1, 0.2 y 0.3 mM de IPTG respectivamente. El carril 5 corresponde a la fracción de proteína soluble del cultivo control a 18°C. Los carriles 6, 7 y 8 corresponden a la fracción de proteína soluble obtenida de cultivos de *E. coli* BL21(DE3)-ASPII/pLysS inducidos a 18°C con 0.1, 0.2 y 0.3 mM de IPTG respectivamente. La flecha blanca indica la banda de la proteína esperada cercana a los 35 kDa en la fracción soluble del cultivo realizado a 25°C con 0.1 mM de IPTG. La flecha negra indica los 34 kDa del marcador de peso molecular, LD (Thermo Scientific). A la izquierda de la figura se indican los pesos del

marcador de peso molecular Thermo Scientific Prestained Protein Molecular Weight Marker (LD).

Con el fin de corroborar que la proteína observada en el gel es la proteína de fusión, L-asparaginasa II, se realizó un western blot con el SuperSignal West HisProbe Kit (Thermo Scientific), con una sonda a base de níquel que se une a la proteína de fusión con cola de polihistidina. En la imagen 16 se observa el gel de proteínas utilizado y el resultado del western blot, el cual fue positivo para la muestra cultivada a 25 °C con 0.1 mM.

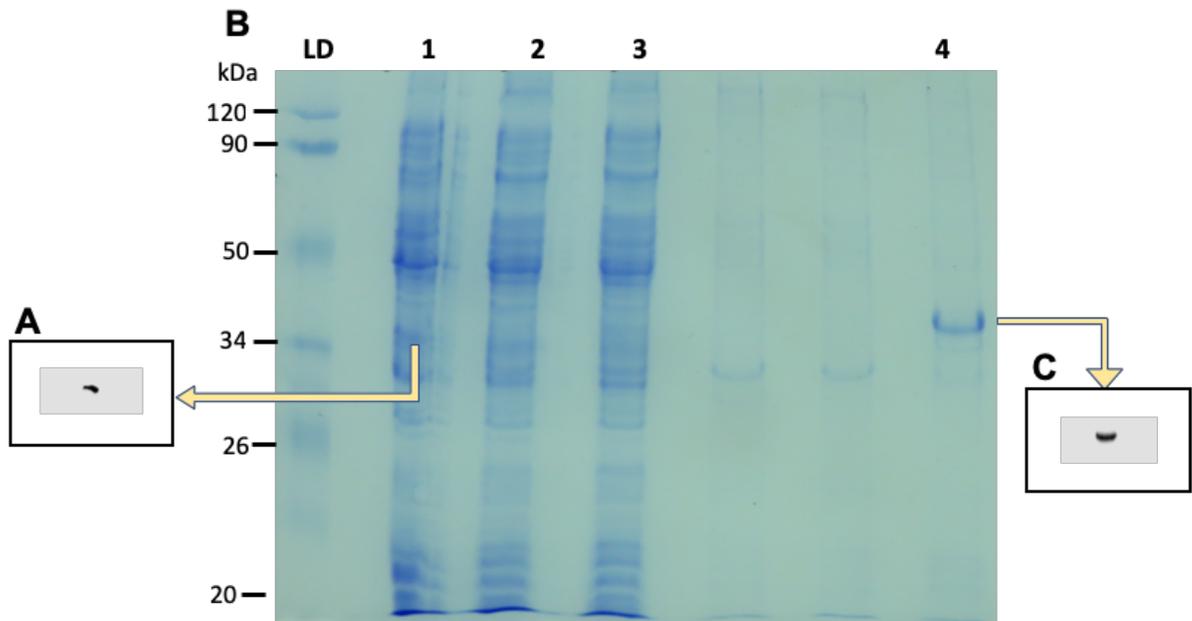


Figura 16. Western blot del extracto proteico soluble obtenido de cultivos inducidos a 25°C con 0.1 mM y 0.2 mM. En la imagen en el panel B se observa el resultado de la electroforesis en gel de poliacrilamida de los extractos proteicos solubles obtenidos de los cultivos inducidos a 25 °C con 0.1 mM (carril 1) y 0.2 mM (carril 2) de IPTG, y a 18°C con 0.1 mM (carril 3) de IPTG, además de un control positivo con la proteína recombinante insoluble (carril 4). A partir de la electroforesis indicada en el

panel B se realizó un western blot, cuyo resultado positivo se observan en el panel A, para la fracción soluble del cultivo inducido a 25°C con 0.1 mM; además del resultado del control positivo indicado en el panel C.

3.4. Ensayos de actividad asparaginasa y glutaminasa a partir de extractos crudos.

Se realizaron dos tipos de ensayos de actividad, uno cualitativo, para corroborar la presencia de la enzima, con rojo fenol y otro cuantitativo con el reactivo de Nessler. En ambos casos se mide la variación de pH del medio debido a la liberación de amonio producto de la hidrólisis de L-asparagina en ácido aspártico y amonio, o de L-glutamina en ácido glutámico y amonio, por parte de la L-asparaginasa II.

3.4.1. Ensayo cualitativo de actividad asparaginasa con rojo fenol.

A partir del lisado de cultivos inducidos a 25°C de *E. coli* BL21 (DE3) co-transformada y de un cultivo control sin el inserto, se realizó un ensayo de actividad preliminar, en presencia de rojo fenol y L-asparagina y se dejó incubar a temperatura ambiente. Después de cuatro días se observó la presencia de actividad L-asparaginasa mediante el cambio de coloración del medio de amarillo a rosado sólo en el cultivo con el vector pET22(+)-ASPII. El cambio de coloración en el medio indica un cambio de pH, el cual se infiere se debe a una mayor cantidad de amonio en la muestra debido a la hidrólisis de L-asparagina en ácido aspártico y amonio, producto de la acción de la enzima recombinante L-asparaginasa II, lo que sugiere la expresión de la enzima en forma activa (Figura 17).

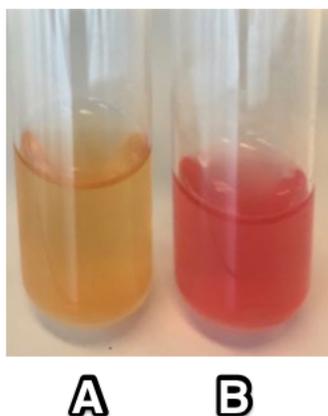


Figura 17. Ensayo cualitativo de actividad asparaginasa con rojo fenol. En A se observa el extracto proteico obtenido del cultivo control, que posee el vector de expresión sin el inserto, en color amarillo después de 4 días. En B, se observa el extracto proteico obtenido del cultivo con el vector pET22(+)-ASP^{II} inducido a 25°C, en color rojo después de 4 días. La variación en la coloración del medio es producida por un cambio de pH, el cual se infiere se debe a la expresión de forma activa de la enzima L-asparaginasa II.

3.4.2. Ensayo cuantitativo de actividad asparaginasa y glutaminasa con el reactivo de Nessler.

Se realizaron ensayos de actividad a partir de cultivos de *E. coli* BL21 (DE3), co-transformadas con los vectores pET22(+)-ASP^{II} y pLysS, cuyas inducciones se llevaron a cabo a distintas temperaturas y con diferentes concentraciones de IPTG. La presencia de actividad asparaginasa se midió a través del cambio en la coloración de la solución con el reactivo de Nessler, el que, debido a una variación del pH a causa de la liberación de amonio, genera coloración amarilla-anaranjada.

Dado que las muestras provienen de extractos crudos, es decir existen múltiples enzimas en el medio, todas las mediciones incluyen un control del cultivo, que corresponde a

cepas de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con el vector pET22(+) sin el inserto que codifica la enzima de interés, de modo que sea posible atribuir el cambio de coloración de la solución a la acción de la L-asparaginasa II recombinante, la que al hidrolizar L-asparagina o L-glutamina generan amonio.

En primera instancia se evaluó la presencia actividad asparaginasa en las fracciones de proteína soluble de cultivos inducidos a 37°C y distintas concentraciones de IPTG (Figura 18). Se realizó análisis de los datos mediante la prueba estadística ANOVA para evaluar la existencia de diferencias significativas entre los cultivos de la cepa de *E. coli* BL21(DE3) co-transformada y el cultivo control, el cual no posee el gen que codifica la L-asparaginasa II. En este caso no se observó una diferencia significativa entre las muestras con el inserto inducidas a 37°C con diferentes concentraciones de IPTG con respecto a la muestra control.

Actividad de muestras inducidas a 37°C, con diferentes concentraciones de IPTG

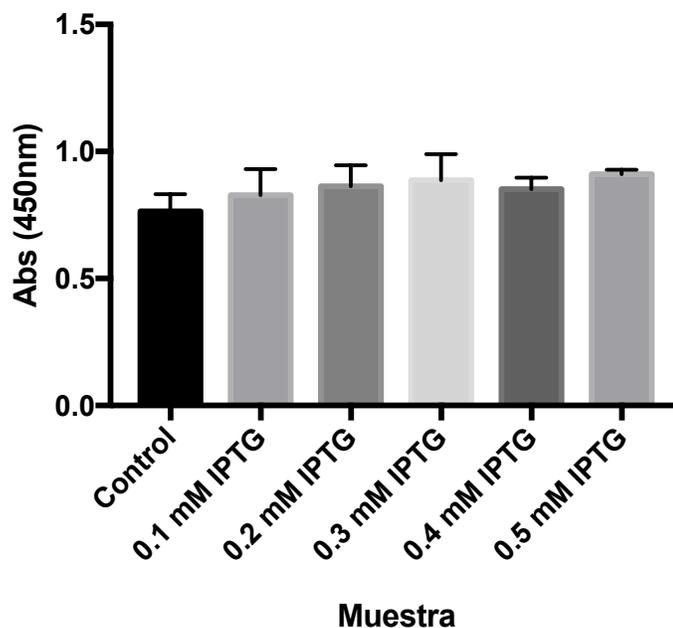


Figura 18. Gráfico de medición de actividad asparaginasa a partir de extractos proteicos solubles obtenidos del cultivo de *E. coli* ASP11/pLysS inducida a 37°C, con distintas concentraciones de IPTG. En el gráfico se evalúa la actividad a través de la medición de la densidad óptica a 450 nm del control sin el inserto y de cada cultivo inducido con 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 mM de IPTG. Mediante el análisis estadístico ANOVA, se determinó que no existen diferencias significativas entre el control y los cultivos inducidos.

Además, se estudió la actividad asparaginasa y glutaminasa de la enzima L-asparaginasa II, en las fracciones de proteína soluble de células cultivadas a 18 y 25°C inducidas a diferentes concentraciones de IPTG. En el caso de los cultivos inducidos a 18°C no se observó una variación significativa de la actividad asparaginasa ni glutaminasa con respecto al cultivo control (Figura 19), lo que coincide con lo observado en los geles de proteínas (Figura 15 y 16), donde no fue posible observar la expresión de la enzima de forma soluble a 18°C.

Actividad de muestras inducidas a 18°C, con diferentes concentraciones de IPTG

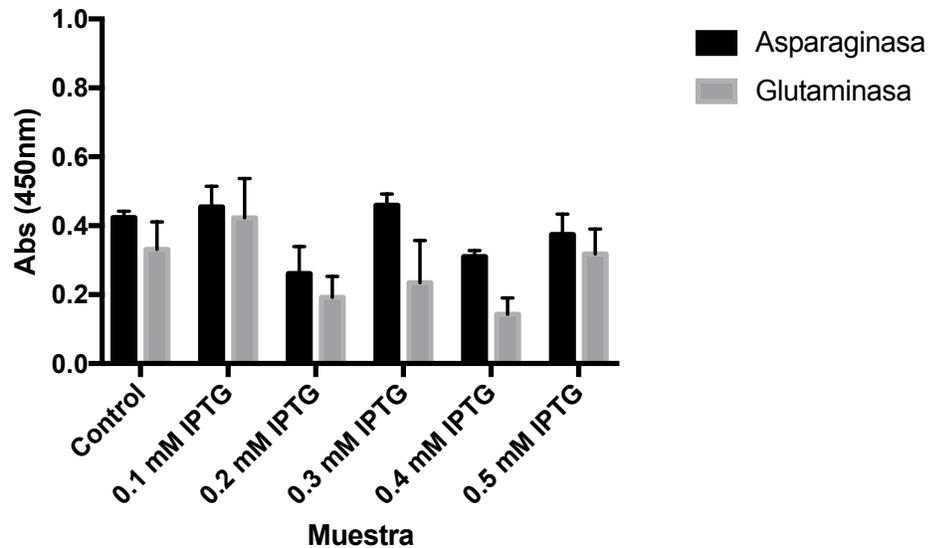


Figura 19. Gráfico de medición de actividad asparaginasa y glutaminasa a partir de extractos proteicos solubles obtenidos del cultivo de cepas *E. coli* ASP11/pLysS inducidas a 18°C, con distintas concentraciones de IPTG. En el gráfico se evalúa la actividad a través de la medición de la densidad óptica a 450 nm del control y de cada cultivo inducido con 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 mM de IPTG. Mediante el análisis estadístico ANOVA, se determinó que no existen diferencias significativas entre el control y los cultivos inducidos.

Por el contrario, a partir de los ensayos de actividad realizados con las fracciones solubles de los cultivos inducidos a 25°C, mediante el análisis de ANOVA se observó diferencias significativas entre el control y las inducciones realizadas con 0.1 y 0.2 mM de IPTG sólo con respecto a la actividad asparaginasa (Figura 20).

Actividad de muestras inducidas a 25°C, con diferentes concentraciones de IPTG

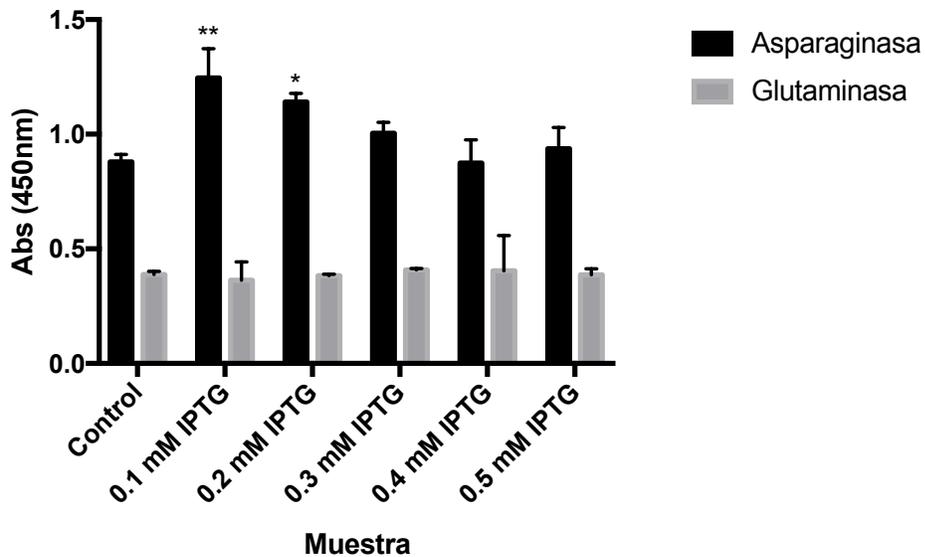


Figura 20. Gráfico de medición de actividad asparaginasa y glutaminasa a partir de extractos proteicos solubles obtenidos de cultivos de cepas *E. coli* ASPII/pLysS inducidas a 25°C, con distintas concentraciones de IPTG. En el gráfico se evalúa la actividad a través de la medición de la densidad óptica a 450 nm del control y de cada cultivo inducido con 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 mM de IPTG. Mediante el análisis estadístico ANOVA, se determinó que existen diferencias significativas entre el control y los cultivos inducidos con 0.1 y 0.2 mM de IPTG.

3.5. Purificación de la enzima recombinante mediante cromatografía Ni-NTA.

Se realizó purificación de distintas muestras mediante cromatografía de afinidad Ni-NTA, la cual consiste en una columna con resina a base de níquel a la cual se adhieren

proteínas de fusión con extremo de polihistinas, las que posteriormente eluyen al agregar una solución con alta concentración de imidazol.

La purificación se realizó en una columna PD10 con la resina, desde la cual se eluyó las muestras de interés; sin embargo, se observó que en las fracciones de elución finales existían múltiples proteínas contaminantes (Figura 21). Se decidió, por lo tanto, modificar el método de purificación, y en vez de utilizar columnas con la resina, realizar cromatografía en batch, la cual consiste en agregar una pequeña cantidad de resina directamente a las muestras, con la finalidad de favorecer la interacción entre el extremo de polihistidinas de la proteína de fusión y la resina circundante.

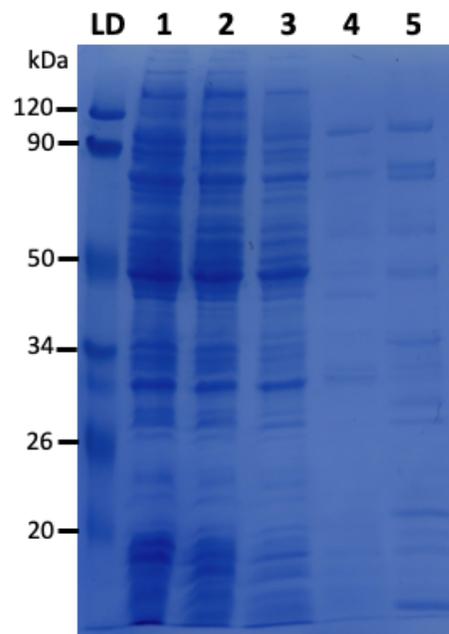


Figura 21. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12,5%, de muestras obtenidas de la purificación mediante cromatografía de afinidad Ni-NTA en columna, a partir del cultivo de *E. coli* ASP11/pLysS inducido a 25°C con 0,1 mM de IPTG. En la imagen se observan la fracción de proteína soluble de cultivos inducidos a 25°C con 0.1 mM de IPTG (carril 1) y las fracciones de elución F1, F2, F3 y F4 obtenidas en cada paso de la

cromatografía de afinidad Ni-NTA de la muestra (carril 2, 3, 4 y 5 respectivamente). A la izquierda de la figura se indican los pesos del marcador de peso molecular Thermo Scientific Prestained Protein Molecular Weight Marker (LD).

A partir del cultivo de *E. coli* ASP11/pLysS inducida a 25°C con 0.1 mM de IPTG, se obtuvo la fracción con proteínas solubles a la cual se agregó 100 uL de resina Ni-NTA. Se dejó en agitación por al menos 1 h a 4°C para luego cargar la resina a una columna vacía. A continuación, como en la cromatografía anterior, las fracciones de elución fueron obtenidas agregando los respectivos buffers. En la imagen 22 se observa la electroforesis con las fracciones soluble e insoluble y a continuación un gel, con las fracciones de elución final, teñidas con nitrato de plata.

Se observa que, si bien se redujo la cantidad de proteínas contaminantes en comparación a la imagen anterior, no se observa proteína recombinante purificada (Figura 22).

Se realizó un ensayo de actividad con reactivo de Nessler a partir de muestras de extracto crudo y de la fracción de elución (Figura 23), cuyo análisis indica que si existe actividad en el extracto crudo del cultivo de *E. coli* ASP11/pLysS en comparación al cultivo control, y no así en las fracciones de purificación, en las que no se observa actividad en las muestras.

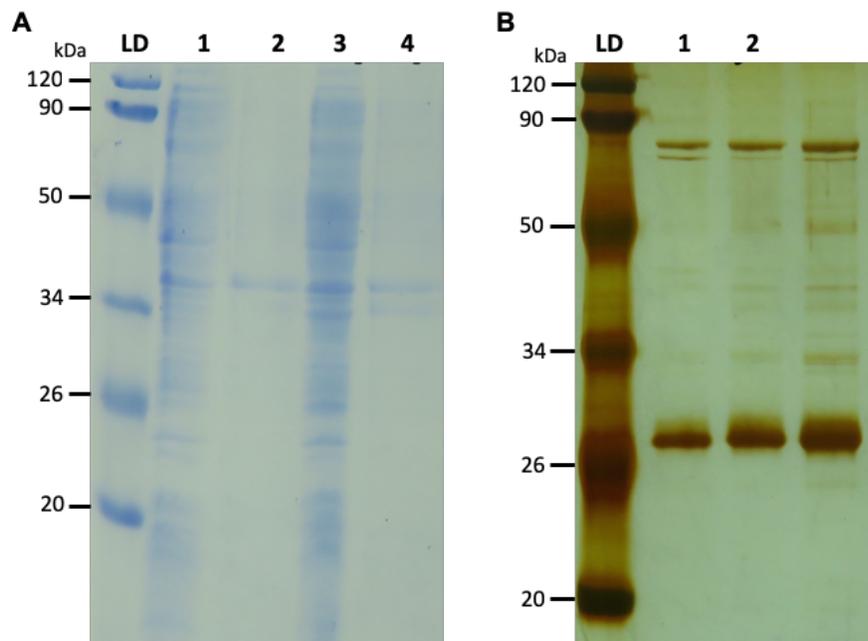


Figura 22. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12,5 % con muestras obtenidas de la purificación realizada a cultivos *E. coli* ASPII/pLysS inducidos a 25°C con 0,1 mM de IPTG y su respectivo control. A. Electroforesis en gel de poliacrilamida teñido con azul de comassie, en la cual se observa el perfil proteico de la fracción soluble e insoluble del cultivo control (carril 1 y 2) y de la fracción soluble e insoluble del cultivo inducido a 25°C con 0.1 mM de IPTG (carril 3 y 4, respectivamente). B. Electroforesis en gel de poliacrilamida teñido con nitrato de plata, en el cual se observan las fracciones de elusión F4 obtenidas de la cromatografía de afinidad Ni-NTA de la fracción proteica soluble del cultivo control (carril 1) y del cultivo inducido a 25°C con 0.1 mM de IPTG (carril 2). A la izquierda de las figuras se indican los pesos del marcador de peso molecular Thermo Scientific Prestained Protein Molecular Weight Marker (LD).

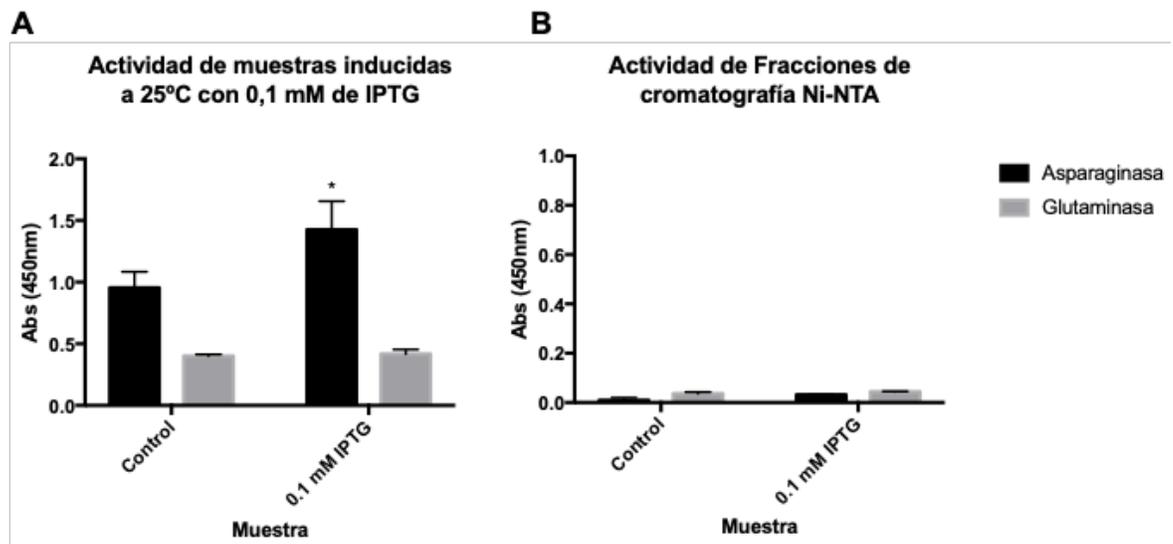


Figura 23. Ensayo de actividad con el reactivo de Nessler, a partir de extracto proteico soluble obtenido del cultivo de *E. coli* ASP11/pLysS inducida a 25°C con 0.1 mM de IPTG (A), y de muestras de la fracción de elución obtenidas a partir de la cromatografía en batch de los mismos cultivos. En el gráfico A se observa la medición de la actividad a partir de extractos proteicos solubles de cultivos control y *E. coli* ASP11/pLysS, inducidos a 25°C con 0,1 mM de IPTG. El gráfico B corresponde a ensayos de actividad de muestras obtenidas de la purificación con cromatografía Ni-NTA en batch, a partir de cultivos control y *E. coli* ASP11/pLysS, inducidos a 25°C con 0,1 mM de IPTG.

3.6. Estimación Actividad L-Asparaginasa II recombinante.

A través de una cuantificación de proteínas con el método de Bradford, se determinó que la concentración de proteína en la fracción soluble de la muestra 25°C 0.1 mM es 2.09 mg/mL. Mediante análisis de imagen de geles con el software Image J se estimó que aproximadamente 0.22 mg/mL corresponde a proteína recombinante.

A partir de una curva de calibración realizada con sulfato de amonio, y dado que por cada molécula del sustrato se libera una molécula de amonio, se determinó que para la muestra ASP 25°C 0.1 mM, se hidrolizaron 2,5 mM de L-asparagina.

Con lo anterior, se estimó la actividad de la enzima recombinante a partir del extracto crudo, restando la concentración de amonio liberado por el control. Se determinó que 0.78 mM de L-asparagina se degradó producto de la actividad de la enzima L-asparaginasa II. A partir de estos datos, se estimó que la enzima posee una actividad específica de 117,81 U/mg. Cabe mencionar, que dado que este cálculo se realizó a partir de un extracto crudo corresponde sólo a una aproximación de la actividad de la enzima.

4. DISCUSIÓN Y PROYECCIONES

El presente trabajo tuvo como objetivo la expresión heteróloga en *Escherichia coli* del gen que codifica la enzima L-asparaginasa II proveniente de la bacteria *Salinispora tropica* CNB 440, y posteriormente evaluar su actividad sobre los sustratos L-asparagina y L-glutamina. Esta asparaginasa no ha sido caracterizada aún y existe interés por descubrir nuevas fuentes de este tipo de enzimas ya que es utilizada en el ámbito clínico como agente quimioterapéutico y en la industria alimentaria, como aditivo para evitar la formación de acrilamida (Singh & Srivastava, 2012).

En el ámbito clínico su propiedad antineoplásica en cierto tipo de células tumorales se debe a que hidroliza la L-asparagina circundante, necesaria para estas células generando la muerte selectiva por desnutrición (Andrade et al., 2014). Sin embargo, existen distintos problemas en el tratamiento, como reacciones de hipersensibilidad, neutralización y efectos secundarios asociados a una actividad inespecífica por parte de la enzima sobre un segundo sustrato, glutamina (Müller & Boos, 1998). Por esta razón, existe interés en encontrar nuevas fuentes de asparinasas con baja o nula actividad inespecífica.

En base a lo anterior, se estudió la aún no descrita L-Asparaginasa II proveniente de *Salinispora tropica* CNB 440. Para ello fue extraída su secuencia codificante a partir del genoma de *Salinispora*, amplificada con los partidores diseñados en este trabajo (Tabla III) y luego clonada en el vector pET22b(+), de tal forma que la secuencia codificante quedara adyacente al sitio his-tag del vector, con el fin de generar una proteína de fusión unida en su extremo carboxilo a múltiples residuos de histidina, y así facilitar su purificación mediante cromatografía de afinidad a níquel.

Colonias de *E. coli* BL21 (DE3) fueron quimiotransformadas con el vector de expresión pET22b(+)-ASPII, obteniéndose una colonia transformante, cuyo vector fue secuenciado corroborando la correcta inserción del gen codificante de la L-asparaginasa II.

Posteriormente se indujo la expresión de la proteína recombinante a 37°C, obteniéndola en la fracción celular insoluble como agregado proteico (Figura 10 y 11).

El principal problema al obtener la proteína de forma insoluble es su alta producción y mal plegamiento generando cuerpos de inclusión. Se espera que al disminuir la temperatura de inducción exista una disminución en la sobreproducción de la proteína y en la sobrecarga transcripcional, favoreciendo de esta forma una producción más lenta y el plegamiento correcto de ellas (Donovan et al., 1996). Otro factor que se manipula para la producción de proteínas recombinantes es la concentración del inductor, en este caso IPTG, utilizado como inductor del operon lac, que se une al represor lacI y lo inactiva, permitiendo la transcripción del gen bajo el control del promotor T7. Usualmente, mayores concentraciones del inductor son usadas para obtener una alta inducción del gen de interés, sin embargo, esto no necesariamente implica una mayor producción de la proteína recombinante en forma soluble (Donovan et al., 1996), ya que en general, a altas concentraciones de IPTG las proteínas se producen como cuerpos de inclusión.

A partir de la variación de estos factores implicados en la inducción proteínas recombinantes, se probó diversas condiciones de inducción, con el fin de producir la proteína recombinante de forma soluble. En primera instancia se cambió el medio de cultivo, a medio TB, para obtener una mayor concentración celular al final del proceso. Luego se varió la temperatura de inducción, de 37°C a 25°C y 18°C, y la concentración

del inductor, IPTG, en un rango de entre 0.1 mM a 0.5 mM para ambas temperaturas sin obtener resultados positivos.

A partir de los resultados obtenidos se evaluó la expresión basal de la proteína, es decir la expresión del gen codificante sin agregar inductor al medio de cultivo. Se observó que en estas condiciones existía producción de la proteína recombinante (Figura 13), es decir expresión del gen basalmente, dificultando de esta manera la modulación del sistema de expresión. Se ha demostrado que una desventaja de los promotores fuertes como el promotor T7, es que las proteínas recombinantes a menudo no logran alcanzar su conformación nativa y se agregan parcial o completamente como cuerpos de inclusión (Chen et al., 2009). Con el fin de solucionar este problema y evitar dicha expresión basal, las células fueron co-transformadas con el vector pLysS (Figura 14), el cual codifica la lisozima T7, un inhibidor natural de la T7 RNA polimerasa, que permite reprimir la inducción basal del promotor T7.

Se realizó la inducción del gen que codifica la proteína recombinante en la cepa co-transformada y se observó que no existía inducción basal del gen blanco (Figura 13), posibilitando de esta manera la modulación de la expresión del gen que codifica la L-asparaginasa II. Se realizaron cultivos de las cepas co-transformadas BL21(DE3) ASPII/pLysS, a 25°C y 18°C con un gradiente de IPTG de 0.1 mM a 0.5 mM para cada condición, y se observó producción de la proteína en forma soluble en los cultivos a 25°C con 0.1 mM y 0.2 mM de IPTG. Con el fin de corroborar que la banda observada correspondía a la proteína L-asparaginasa II recombinante, se realizó western blot de las muestras con las sondas HisProbe-HPR (Thermo Scientific), que se unen al extremo de polihistidina y emiten fluorescencia. Se logró confirmar la presencia de L-asparaginasa soluble en el cultivo a 25°C con 0.1 mM de IPTG.

Además, se realizó un ensayo de actividad L-asparaginasa preliminar cualitativo en el cultivo anterior y en un cultivo control utilizando el reactivo rojo fenol, cuyo color cambia según la variación de pH, el cual se modifica producto de un aumento de amonio en el medio producido por hidrólisis de L-asparagina por acción de la L-asparaginasa II. El resultado obtenido (Figura 17) indica que la proteína recombinante fue producida de forma soluble y se encuentra activa a 25°C. La expresión de la proteína activa a esta temperatura podría estar relacionado con la temperatura óptima de crecimiento del microorganismo de origen, el actinomicete *Salinispora tropica* CNB 440, que corresponde a 28.5°C (Contador et al., 2015).

Con el fin de evaluar la expresión de L-asparaginasa activa en la fracción soluble, se realizó ensayos de actividad a partir de la fracción celular soluble del extracto crudo de cultivos inducidos a 37°C, 25°C y 18°C con distintas concentraciones de IPTG. Los ensayos fueron realizados utilizando el método de Nessler, el que mediante la variación del color del reactivo de Nessler mide la cantidad de amonio liberado en solución producto de la actividad de la enzima L-asparaginasa II sobre los sustratos L-asparagina y L-glutamina. Para estos ensayos también se contó con un control que consistía células *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con el vector pET22b(+) sin el inserto codificante de la enzima de interés.

Los datos obtenidos fueron analizados mediante el test de ANOVA. Los resultados mostraron diferencias estadísticamente significativas en la degradación del sustrato L-asparagina para las fracciones solubles de los cultivos inducidos a 25°C con 0.1 mM y 0.2 mM de IPTG, las que serían atribuibles a la acción de la L-asparaginasa II recombinante. (Figura 20). Para las otras temperaturas y concentraciones no se observó diferencias significativas con respecto al control, lo que indica que no se obtuvo

producción soluble activa de la L-asparaginasa II en dichas condiciones. La ausencia L-asparaginasa II soluble y activa en las fracciones solubles de los cultivos inducidos a 37°C coincide con el resultado que indica que, a esta temperatura, la proteína se produce como cuerpos de inclusión, los que no presentan actividad a 37°C. Por otra parte, la ausencia de actividad enzimática atribuible a la L-asparaginasa II recombinante en los cultivos inducidos a 18°C, puede deberse a una baja productividad a esta temperatura; notar que la actividad del cultivo control (sin el inserto) a 18°C, el cual posee las proteínas nativas de *E. coli*, disminuye a aproximadamente un tercio del valor observado a 37°C, lo que indica que esta temperatura es inadecuada para el crecimiento óptimo de este tipo de bacterias.

En cuanto a la actividad inespecífica por parte de la enzima sobre L-glutamina como segundo sustrato, el análisis de los datos mostró que no hay diferencias significativas con respecto al control, lo que indica que no fue posible detectar actividad glutaminasa atribuible a la L-asparaginasa II recombinante.

Los resultados analizados son prometedores en cuanto a la selectividad de la enzima, ya que indican que la L-asparaginasa II en estudio no tendría actividad glutaminasa inespecífica. No obstante, considerando que los datos fueron obtenidos a partir de extractos crudos, es necesario medir la actividad glutaminasa de la enzima a partir de muestras de proteína purificada para tener certeza de su selectividad.

Con este fin, una vez seleccionadas las condiciones de inducción para la producción de la enzima recombinante y evaluada su actividad a partir de extractos crudos, se inició la purificación de ella mediante cromatografía de afinidad a níquel, denominada cromatografía Ni-NTA. Ésta se basa en la alta afinidad que posee el extremo de polihistidina, fusionado al extremo carboxilo de la L-asparaginasa II, con los cationes

divalentes de la resina de níquel, uniéndose reversiblemente a ella. En la figura 24 se ejemplifica la interacción entre los residuos de histidina y los iones divalentes de níquel unidos a la matriz.

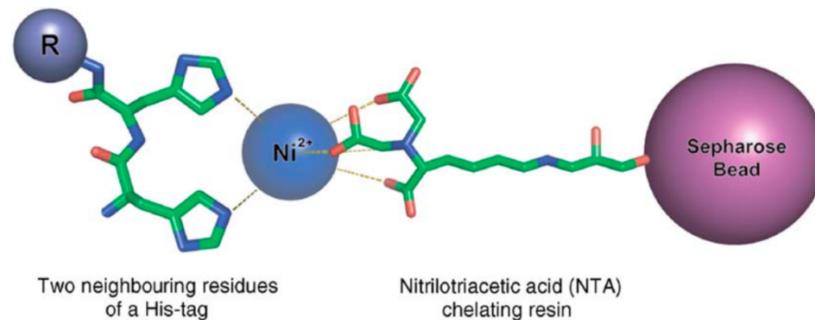


Figura 24. Esquema del mecanismo de interacción entre residuos de histidinas, de la cola de polihistidinas, con los iones níquelosos de la resina Ni-NTA. Existen dos sitios de coordinación disponibles en el ion de níquel, que pueden ser captados por los átomos de nitrógeno de dos residuos de histidina adyacentes, de la cola de polihistidina anclada a una proteína recombinante, mecanismo en el cual se basa la cromatografía de afinidad. La interacción entre el ion níqueloso y la proteína anclada a cola de polihistidinas es reversible, desprendiéndose la proteína mediante competencia por adición de imidazol a la fase móvil o por protonación de los residuos de histidina al disminuir el pH. Esquema extraído de Bolanos-Garcia & Davies, 2006.

La cromatografía fue realizada en una columna con resina Ni-NTA a partir de la fracción soluble del cultivo de BL21(DE3) ASP11/pLysS inducidos a 25°C con 0.1 mM de IPTG. Para la cromatografía se realizó un gradiente de imidazol escalonado, con un escalón a baja concentración de imidazol (16 mM) para minimizar la interacción de proteínas contaminantes, eliminando en esta etapa las proteínas unidas débilmente a la columna. Las proteínas unidas fuertemente a la resina son recobradas por elución con una alta

concentración de imidazol (300 mM). Los resultados mostraron que en la fracción de elución final, donde se desprenden todas aquellas unidas fuertemente a la resina, existían múltiples proteínas contaminantes, y no fue posible distinguir la proteína de interés, lo que evidencia una baja selectividad del método en las condiciones probadas (Figura 21).

Se modificó entonces el método de purificación, realizando cromatografía en batch, la que consiste en agregar bajas cantidades de resina directamente a la fracción soluble de la muestra y dejarla incubando en agitación con el fin de favorecer la afinidad de la proteína de fusión con los iones divalentes de níquel de la resina, reduciendo las interacciones inespecíficas, que pueden producirse con un uso excesivo de resina.

Como resultado de la variación del método de purificación, se obtuvo una disminución de proteínas contaminantes reduciéndose a tres (Figura 22); sin embargo, tampoco fue posible visualizar la proteína de fusión. A partir de estos resultados se infiere que ésta presenta muy baja afinidad a la resina, ya que en su mayoría eluyó en el primer lavado, donde se desprenden las proteínas contaminantes que no se unen a la resina de níquel (Anexo 3).

La cromatografía de afinidad a metales es una de las técnicas de purificación de un solo paso más utilizadas para la purificación de proteínas recombinantes; sin embargo aproximadamente en un 20% de los casos las purificaciones presentan problemas por diversos factores (Bolanos-Garcia & Davies, 2006). Uno de ellos se debe a la proteólisis de la cola de histidinas, lo cual se descarta en este caso ya que es posible observar la proteína mediante western blot de la fracción soluble (Figura 16). Además, fue posible purificar la proteína recombinante a partir de la fracción celular insoluble, mediante cromatografía Ni-NTA en condiciones denaturantes (Figura 11).

Otro factor limitante para la correcta purificación, es la presencia de proteínas nativas de *E. coli* que muestran una alta afinidad por los cationes divalentes como el ion níqueloso. Esta unión se debe principalmente a que presentan funciones nativas de unión a metales o presentan regiones con grupos de residuos de histidinas en su superficie (Bolanos-Garcia & Davies, 2006). Lo mencionado anteriormente puede explicar la presencia tres proteínas contaminantes en la cromatografía en batch, las que tendrían mayor afinidad por la resina Ni-NTA que la enzima con extremo de polihistidina de interés.

Se ha estudiado que un factor por el que la purificación de las proteínas de fusión se ve limitada en muchas ocasiones, es que presentan baja afinidad de unión a la matriz debido a que el extremo de polihistidina se encuentra parcialmente oculta de la superficie de la proteína (Bolanos-Garcia & Davies, 2006). Considerando que fue posible la purificación de la enzima desde la fracción insoluble mediante cromatografía en condiciones denaturantes (Figura 11), donde la proteína se encuentra denaturada y con ello la cola desplegada, es probable que en la estructura plegada de la L-Asparaginasa II el extremo de polihistidina no se encuentre expuesto.

En base a esto se cree que la L-asparaginasa II de fusión posee baja afinidad a la resina de níquel debido a que la cola de polihistidina unida a su extremo carboxilo no se encuentra desplegada y expuesta para anclarse a la resina.

Con el fin de respaldar la idea de que la baja afinidad de la proteína de fusión a la resina se debe a que el extremo de polihistidinas no se expone en la superficie de la proteína, se estudió el modelo tridimensional de la L-asparaginasa II de *E. coli* (Swain et al., 1993), organismo modelo que posee un 29% de identidad con la secuencia de la L-asparaginasa II proveniente de *S. tropica*; y el modelo tridimensional de la asparaginasa de *Acinetobacter glutaminasificans* (Lubkowski et al., 1994), única amidrohidrolasa

cristalografiada de la clase actinobacteria con la que la L-asparaginasa II proveniente de *S. tropica* posee un 45% de identidad. Ambas enzimas son activas en forma de homotetrámero.

En las Figuras 25.A y 25.B se observan los monómeros de las asparaginasas provenientes de *E. coli* y de *A. glutaminasificans* respectivamente, cuyos extremos C-terminal, donde debería ir anclada la cola de polihistidinas en el caso de nuestra proteína de fusión, se señalan con una flecha blanca. Como se puede observar en ambos casos, los extremos carboxilo de los monómeros poseen un plegamiento hacia el interior de la proteína.

En base a este análisis se puede suponer que es posible que ocurra un fenómeno similar en la estructura de la L-Asparaginasa II proveniente de *Salinispora tropica*, de la cual no se posee información sobre su estructura cristalina, ni estudios de su estructura tridimensional; es decir, que no se expone hacia la superficie de la proteína la cola de polihistidinas unida al extremo carboxilo. Se propone entonces que la causa de que la proteína no se uniera a la resina es probablemente debido a que el extremo de polihistidina no se encuentre desplegado y expuesto, impidiendo así su interacción con los iones divalentes de níquel de la resina y con ello su anclaje a la matriz.

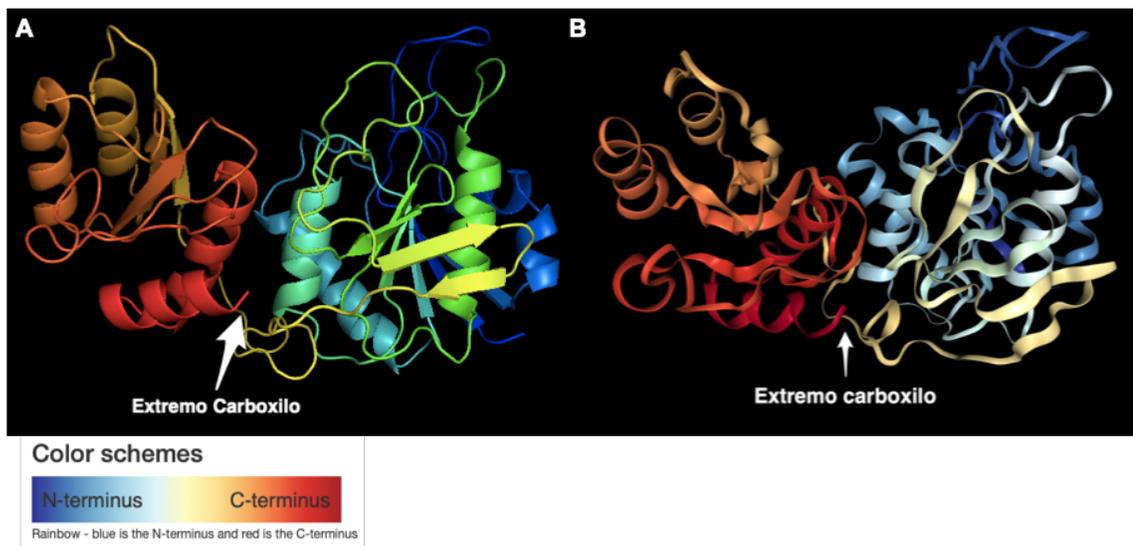


Figura 25. Esquema de la estructura tridimensional de la L-asparaginasa II (ECA3) de *E. coli*, y de la asparaginasa-Glutaminasa de *A. glutaminasificans*. En 25.A se observa la estructura tridimensional del monómero de la L-asparaginasa II proveniente de *E. coli*. En 25.B se observa la estructura tridimensional del monómero de la asparaginasa-glutaminasa de *A. glutaminasificans*. En ambos casos la flecha blanca señala el extremo carboxilo terminal, donde en el caso de nuestra proteína recombinante va adherido el extremo de polihistidinas. Abajo se adjunta leyenda del significado del modelo de cintas. El modelo fue extraído de la base de datos RCSB PDB a partir de la estructura cristalina de la proteína y visualizado en el programa PyMOL.

Finalmente se midió la actividad con el reactivo de Nessler de la fracción purificada, donde no se logró detectar actividad glutaminasa ni asparaginasa (Figura 23), lo que concuerda con la ausencia de la enzima recombinante en la fracción de elución.

Se realizó entonces una aproximación de la actividad enzimática asparaginasa de la proteína recombinante a partir de la fracción soluble de cultivos de *E. coli* ASP11/pLysS inducidos a 25°C con 0.1 mM de IPTG. Se utilizó como control una cepa transformada

con un vector sin el inserto, y que, por lo tanto, expresa las proteínas nativas de *E. coli* inducidas bajo las mismas condiciones de cultivo. Se realizaron los ensayos de actividad utilizando L-asparagina como sustrato y se calculó la cantidad de amonio liberado en las muestras producto de la hidrólisis de L-asparagina para las fracciones solubles de los cultivos de *E. coli* ASP11/pLysS y control. Se consideró el amonio presente en el ensayo correspondiente al cultivo control, como producto de la actividad de las proteínas endógenas de *E. coli*. Con esto, se estimó que el amonio liberado por acción de la L-Asparaginasa II recombinante, correspondería a la diferencia entre el amonio medido en los ensayos de las muestras de los cultivos de *E. coli* ASP11/pLysS y el amonio de las muestras de los cultivos control. Se estimó la cantidad de proteína recombinante en las fracciones de proteína soluble de los cultivos de *E. coli* ASP11/pLysS. Con esto, se realizó una aproximación de la actividad específica cercana a 117,81 U/mg, de la L-asparaginasa II recombinante proveniente de *S. tropica* CNB 440.

Se considera que esta aproximación de la actividad enzimática de la L-asparaginasa II recombinante es prometedora, teniendo en cuenta que fue calculada a partir de extractos crudos y que, en general, al purificar las enzimas se establece con exactitud la actividad enzimática y puede aumentar varias veces su valor.

Al comparar el resultado de la estimación de la actividad específica de la L-asparaginasa II recombinante, derivada de *S. tropica* CNB 440, con la actividad específica de la L-asparaginasa II de uso comercial (Elspar®) derivada de *E. coli*, que corresponde a 225 U/mg, se puede considerar que la enzima en estudio presenta resultados prometedores. El valor de actividad específica obtenido es cercano al de la enzima de uso comercial Elspar®. Además, los resultados preliminares muestran que esta enzima no registra

actividad inespecífica glutaminasa, no obstante, esto debe confirmarse evaluando la actividad de la enzima recombinante purificada.

A partir de los resultados obtenidos, se considera que se debe continuar con la investigación para la caracterización de la L-asparaginasa II recombinante derivada de *S. tropica* CNB 440. Se sugiere estudiar otros métodos cromatográficos de purificación, o bien, realizar la purificación por cromatografía Ni-NTA en condiciones denaturantes seguida de un proceso de renaturación, con el fin de obtener la enzima purificada para la caracterización de su cinética enzimática.

5. CONCLUSIONES

A partir del presente seminario de título, cuyo principal objetivo fue la expresión en *E. coli* L-asparaginasa II proveniente de *S. tropica* CNB 440 y la evaluación de su actividad, se logró amplificar por PCR el gen *Strop_0315* desde DNA genómico de *S. tropica*, el cual codifica una L-asparaginasa II aún no descrita, su ligación al vector de expresión pET22b(+), y su clonamiento en *E. coli* BL21 (DE3) mediante quimiotransformación.

Además, con el fin de controlar la inducción basal, las cepas de *E. coli* BL21 (DE3) fueron co-transformadas los vectores pET22b(+)-ASP y pLysS, haciendo posible así su expresión de forma soluble y activa a 25°C con 0.1 mM de IPTG.

Los ensayos de actividad realizados a partir de extractos proteicos solubles entregaron resultados prometedores sobre la actividad enzimática sobre los sustratos L-asparagina y L-glutamina, ya que no se detectó actividad inespecífica por parte de la enzima. Sin embargo, es necesario medir la actividad de la proteína purificada para confirmar este resultado. La aproximación de la actividad específica para la L-asparaginasa II, fue de 117,81 U/mg, resultado que se considera positivo en comparación a la actividad de la enzima comercial.

Se infiere que la purificación de la proteína desde la fracción soluble no fue posible debido a que el plegamiento de la L-asparaginasa II recombinante impide la exposición del extremo de polihistidinas anclado a su extremo carboxilo.

En base a los resultados prometedores obtenidos en esta investigación, se sugiere estudiar en otros métodos de purificación con el fin de obtener la enzima, para la caracterización de su cinética enzimática.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Andrade, Augusto F; Borges, Kleiton S; Silveira, V. S. (2014). Update on the Use of L-Asparaginase in Infants and Adolescent Patients with Acute. *Clinical Medicine Insights: Oncology*, 95–100. <https://doi.org/10.4137/CMO.S10242>.
- Bolanos-Garcia, V. M., & Davies, O. R. (2006). Structural analysis and classification of native proteins from *E. coli* commonly co-purified by immobilised metal affinity chromatography. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1760, 1304–1313. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2006.03.027>
- Cachumba, J. J. M., Antunes, F. A. F., Peres, G. F. D., Brumano, L. P., Santos, J. C. Dos, & Da Silva, S. S. (2016). Current applications and different approaches for microbial L-asparaginase production. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47, 77–85. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.004>
- Campbell, H. A., Mashburn, L. T., Boyse, E. A., & Old, L. J. (1967). Two L-Asparaginases from *Escherichia coli* B. Their Separation, Purification, and Antitumor Activity. *Biochemistry*, 6, 721–730. <https://doi.org/10.1021/bi00855a011>
- Chen, C., Wang, J., Yang, P., Zhou, Y., & Zhang, Z.-F. (2009). Expression, purification of tetanus toxin C fragment/cardiotrophin-1 recombinant fusion protein, target delivery to CNS and neurotrophin biology ability. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi [Chinese Journal of Surgery]*, 47, 202–205. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(99\)00003-8](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(99)00003-8)
- Chohan, S. M., & Rashid, N. (2013). TK1656, a thermostable L-asparaginase from *thermococcus kodakaraensis*, exhibiting highest ever reported enzyme activity. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 116(4), 438–443.

<https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2013.04.005>

Contador, C. A., Rodríguez, V., Andrews, B. A., & Asenjo, J. A. (2015). Genome-scale reconstruction of *Salinispora tropica* CNB-440 metabolism to study strain-specific adaptation. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 108, 1075–1090. <https://doi.org/10.1007/s10482-015-0561-9>.

Dharmaraj, S. (2011). Study of L-asparaginase production by *Streptomyces noursei* MTCC 10469, isolated from marine sponge *Callyspongia diffusa*. *Iranian Journal of Biotechnology*, 9(2), 102–108.

Dhevagi, P., & Poorani, E. (2006). Isolation and characterization of L -asparaginase from marine actinomycetes. *Indian Journal of Biotechnology*, 5, 514–520.

Dias, F. F. G., Ruiz, A. L. T. G., Torre, A. Della, & Sato, H. H. (2016). Purification, characterization and antiproliferative activity of L-asparaginase from *Aspergillus oryzae* CCT 3940 with no glutaminase activity. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6, 785–794. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2016.07.007>

Dineshkumar, K., Aparna, V., Madhuri, K. Z., & Hopper, W. (2014). Biological activity of sporolides A and B from *Salinispora tropica*: In silico target prediction using ligand-based pharmacophore mapping and in vitro activity validation on HIV-1 reverse transcriptase. *Chemical Biology and Drug Design*, 83, 350–361. <https://doi.org/10.1111/cbdd.12252>

Donovan, R. S., Robinson, C. W., & Click, B. R. (1996). Review: Optimizing inducer and culture conditions for expression of foreign proteins under the control of the lac

promoter. *Journal of Industrial Microbiology*, 16, 145–154.
<https://doi.org/10.1007/BF01569997>

IARC. (1994). Acrylamide. *IARC Monographs*, 60, 389–433.

Jain, R., Zaidi, K. U., Verma, Y., & Saxena, P. (2012). L-Asparaginase : A Promising Enzyme for Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia. *Pjsr*, 5, 29–35.

Jayaprakashvel, M. (2012). Therapeutically Active Biomolecules From Marine Actinomycetes. *Journal of Modern Biotechnology*, 1, 1–7.

Kieser, T., Foundation, J. I., Bibb, M. J., Buttner, M. J., Chater, K. F., & Hopwood, D. A. (2000). *Practical Streptomyces Genetics*. John Innes Foundation. Retrieved from <https://books.google.cl/books?id=0Hh2QgAACAAJ>

Kumar, S., Venkata Dasu, V., & Pakshirajan, K. (2011). Purification and characterization of glutaminase-free l-asparaginase from *Pectobacterium carotovorum* MTCC 1428. *Bioresource Technology*, 102, 2077–2082.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.07.114>

Lubkowski, J., Wlodawer, A., Housset, D., Weber, I. T., Ammon, H. L., Murphy, K. C., & Swain, A. L. (1994). Refined structure of *Acinetobacter glutaminasificans* glutaminase-asparaginase. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 50, 826–832. <https://doi.org/10.1107/S0907444994003446>

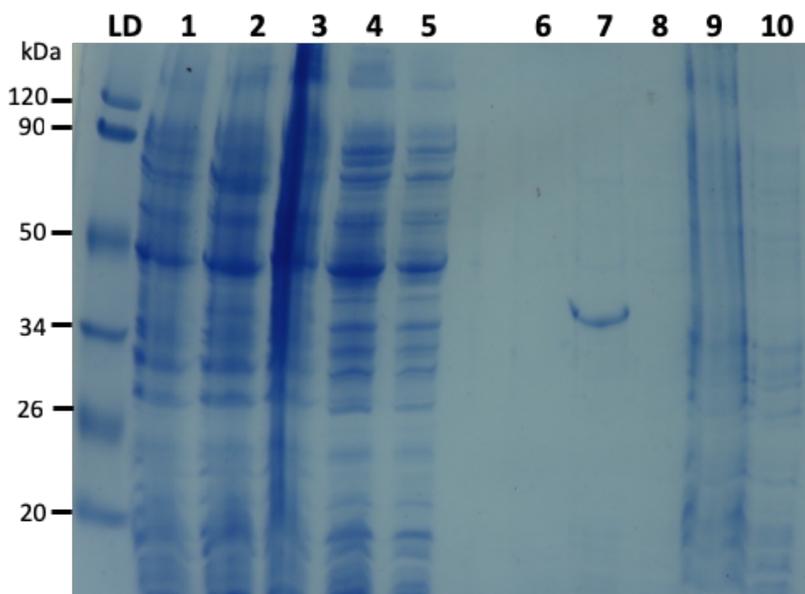
Mahajan, R. V., Kumar, V., Rajendran, V., Saran, S., Ghosh, P. C., & Saxena, R. K. (2014). Purification and characterization of a novel and robust L-asparaginase having low-glutaminase activity from *bacillus licheniformis*: In vitro evaluation of anti-

- cancerous properties. *PLoS ONE*, 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099037>
- Mahajan, R. V., Saran, S., Kameswaran, K., Kumar, V., & Saxena, R. K. (2012). Efficient production of L-asparaginase from *Bacillus licheniformis* with low-glutaminase activity: Optimization, scale up and acrylamide degradation studies. *Bioresource Technology*, 125, 11–16. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.08.086>
- Müller, H. J., & Boos, J. (1998). Use of L-asparaginase in childhood ALL. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 28, 97–113. [https://doi.org/10.1016/S1040-8428\(98\)00015-8](https://doi.org/10.1016/S1040-8428(98)00015-8)
- Nakamura, N., Morikawa, Y., & Tanaka, M. (2014). L-Asparaginase from *Escherichia coli*, 1369. <https://doi.org/10.1080/00021369.1971.10859979>
- National Center for Biotechnology Information. (2009). *Salinispora tropica* CNB-440, Gene Strop_0315- Nucleotide - NCBI. Retrieved June 12, 2018, from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/CP000667.1?report=genbank&from=367170&to=368195>
- Senthil Kumar. M, Selvam. K, Singaravel. R, K. N. (2014). Regulation of Operative Biomarkers Production by Treating with Marine Actinomycetes L-Asparaginase in HepG2 Cell Line. *Journal of Applied & Environmental Microbiology*, 2, 74–80. <https://doi.org/10.12691/jaem-2-3-3>
- Singh, Y., & Srivastava, S. K. (2012). Screening and characterization of microorganisms capable of producing antineoplastic drug , L-asparaginase. *International Journal of Biological & Medical Research*, 3, 2548–2554.

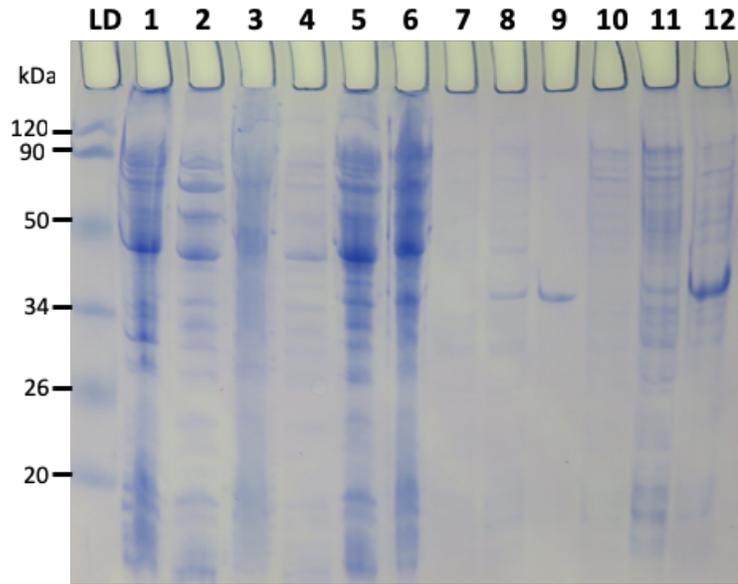
- Solanki, R., Khanna, M. et al. (2008). Bioactive compounds from marine actinomycetes. *Indian Journal of Microbiology*, 48, 410–431. <https://doi.org/10.1007/s12088-008-0052-z>
- Swain, A. L., Jaskolski, M., Housset, D., Rao, J. K., & Wlodawer, A. (1993). Crystal structure of *Escherichia coli* L-asparaginase, an enzyme used in cancer therapy. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 90, 1474–1478. <https://doi.org/10.2210/PDB3ECA/PDB>
- Van Den Berg, H. (2011). Asparaginase revisited. *Leukemia and Lymphoma*, 52, 168–178. <https://doi.org/10.3109/10428194.2010.537796>
- Wakil, S. M., & Adelegan, A. A. (2015). Screening , Production and Optimization of L-Asparaginase From Soil Bacteria Isolated in Ibadan , South-western Nigeria. *Journal of Basic and Applied Sciences*, 11, 39–51.

7. ANEXO

7.1. Anexo 1. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12.5 % de cultivos control y de *E. coli* BL21 (DE3) transformada con el vector pET22(+)-ASP, cultivadas a 18°C en medio TB y AIM. El carril 1, 2 y 3 corresponden a la fracción soluble del cultivo control a 18°C y de *E. coli* BL21(DE3)-ASPII inducida a 18°C con 0.3 y 0 mM de IPTG respectivamente. Los carriles 6, 7 y 8 corresponden a la fracción insoluble del cultivo control a 18°C y de *E. coli* BL21(DE3)-ASPII inducida a 18°C con 0.3 y 0 mM de IPTG respectivamente. Los carriles 4 y 5 son la fracción soluble del cultivo control y de *E. coli* BL21(DE3)-ASPII a 18°C en medio AIM. Los carriles 9 y 10 son la fracción insoluble del cultivo control y de *E. coli* BL21(DE3)-ASPII a 18°C en medio AIM. A la izquierda de la figura se indican los pesos del marcador de peso molecular Thermo Scientific Prestained Protein Molecular Weight Marker (LD).



7.2. Anexo 2. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12.5 % de cultivos control y de *E. coli* BL21 (DE3) transformada con el vector pET22(+)-ASP, cultivadas a 25°C en medio TB y AIM. El carril 1 y 2 corresponden a la fracción soluble del cultivo control a 25°C y de *E. coli* BL21(DE3)-ASPII inducida a 25°C con 0.3 mM de IPTG en medio TB, respectivamente. El carril 3 es la fracción soluble del cultivo de *E. coli* BL21(DE3)-ASPII inducido a 37°C con 0.3 mM de IPTG en medio TB. Los carriles 4 y 5 son la fracción soluble del cultivo control y de *E. coli* BL21(DE3)-ASPII a 25°C en medio AIM. El carril 6 corresponde a la fracción soluble del cultivo de *E. coli* BL21(DE3)-ASPII a 37°C en medio AIM. Los carriles 7 y 8 son la fracción insoluble del cultivo control a 25°C y de *E. coli* BL21(DE3)-ASPII inducida a 25°C con 0.3 de IPTG en medio TB, respectivamente. El carril 9 corresponde a la fracción insoluble del cultivo de *E. coli* BL21(DE3)-ASPII inducido a 37°C con 0.3 mM de IPTG en medio TB. Los carriles 10 y 11 son la fracción insoluble del cultivo control y de *E. coli* BL21(DE3)-ASPII a 25°C en medio AIM respectivamente. El carril 12 corresponde a la fracción insoluble del cultivo de *E. coli* BL21(DE3)-ASPII a 37°C en medio AIM. A la izquierda de la figura se indican los pesos del marcador de peso molecular Thermo Scientific Prestained Protein Molecular Weight Marker (LD).



7.3. Anexo 3. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12.5 % de fracciones de proteínas no unidas obtenidas de cromatografía Ni-NTA a partir de cultivos control y de *E. coli* BL21 (DE3) pET22(+)-ASP/pLysS, cultivadas a 25°C en medio TB con 0.1mM y 0.2 mM de IPTG.

