

*PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN
PARCIAL DE UNA PROTEASA BACTERIANA
ACTIVA A BAJA TEMPERATURA*

*Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas-
PEDECIBA*

Lic. Natalia Fullana

Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas

Opción Biología Celular y Molecular

PEDECIBA BIOLOGÍA

Agosto 2014

*PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE UNA PROTEASA BACTERIANA
ACTIVA A BAJA TEMPERATURA*

Lic. Natalia Fullana

Orientadora: Dra. Susana Castro-Sowinski

Tribunal:

Dra. Adriana Esteves

Dra. Laura Franco Fraguas

Dr. Raúl Platero

Sección Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias, UdelaR

Agradecimientos

En primer lugar a Su, por incluirme en su grupo de trabajo, y orientarme durante esta Tesis de Maestría. Gracias por la paciencia, el entusiasmo, el cariño y la confianza.

A Mónica Marín por el apoyo que me brindó en tantas ocasiones durante todo este tiempo en el laboratorio.

A todos los compañeros de la 314 (Andrea, Mariana, Juan, Natalie, Mathias, Eliana) por compartir el entusiasmo y hacer del laboratorio un lugar tan lindo en donde trabajar día a día.

A Ceci Martínez, que me introdujo en la temática Antártica y me orientó en los primeros meses de trabajo en el grupo.

A la Unidad de Microbiología Estructural del IP de París, en particular al Dr. JM Betton, que me recibió en su laboratorio y me enseñó muchísimo.

A mis padres, mis hermanos y a Diego, por el amor, la paciencia y el apoyo incondicional.

A la ANII por otorgarme la beca de Maestría.

A los miembros del tribunal que aceptaron leer esta Tesis de Maestría.

Contenido

Resumen	6
Introducción.....	8
I. Enzimas proteolíticas	8
Generalidades	8
Clasificación de proteasas.....	10
Producción de proteasas por diferentes organismos - Aplicaciones industriales	15
II. Microorganismos adaptados al frío – fuente de enzimas novedosas	21
III. Enzimas adaptadas a las bajas temperaturas	22
IV. Proteasas activas a bajas temperaturas - potencial tecnológico.....	25
V. La Antártida- fuente de recursos genéticos para la biotecnología	27
VI. Antecedentes y justificación	28
OBJETIVOS.....	33
Objetivo general:	33
Objetivos específicos	33
Materiales y Métodos.....	34
I. Cepas y plásmidos utilizados en este trabajo	34
II. Identificación de la proteasa MP10 de Pseudomonas sp. AU10 en el sobrenadante del cultivo	35
Crecimiento de AU10 y análisis del sobrenadante de cultivo.....	35
Actividad proteolítica en el sobrenadante de cultivo.....	36
Identificación de la proteasa por espectrometría de masas EM-MALDI TOF.....	37
III. Identificación del gen codificante de la proteasa MP10.....	37
Diseño de cebadores degenerados y amplificación de una región parcial del gen mp10.....	37
Obtención de la secuencia completa del gen mp10	39
IV. Análisis in silico de la proteasa MP10	43

V.	Producción de la proteasa recombinante en <i>E. coli</i>	43
	Construcción del vector de expresión pMP10-H6	43
	Transformación de las cepas de expresión	44
	Producción de la proteasa MP10 en diferentes cepas de expresión de <i>E. coli</i>	45
	Expresión de MP10 en <i>E. coli</i> C41. Ensayo a baja temperatura.....	46
	Ruptura y fraccionamiento celular.....	46
VI.	Plegamiento <i>in vitro</i> de MP10 y purificación por cromatografía de afinidad a metales	47
	Co-transformación de la cepa de expresión con el plásmido pDIA17 y el vector de expresión ..	47
	Producción y purificación de cuerpos de inclusión.....	48
	Plegamiento <i>in vitro</i> de MP10 por el método de dilución rápida.....	49
	Efecto del calcio en el plegamiento de MP10.....	49
	Purificación de MP10 recombinante por cromatografía de afinidad a metales.....	50
	Cuantificación de MP10 recombinante	51
	Inmunodetección de MP10 por western blot.....	51
VII.	Caracterización parcial de la enzima recombinante.....	52
	Determinación de actividad proteolítica	52
	Determinación de pH óptimo	53
	Efecto de la temperatura sobre a actividad.....	53
	Inhibición con EDTA	54
VIII.	Producción y purificación de la enzima nativa a partir del cultivo de <i>Pseudomonas</i> sp. AU10	55
	Cultivo de <i>Pseudomonas</i> sp. AU10 en medio PFm	55
	Purificación de la proteasa nativa a partir del sobrenadante del cultivo	55
IX.	Obtención del espectro de dicroísmo circular para la proteasa nativa y recombinante.....	56
	Resultados.....	57
I.	Identificación de la proteasa extracelular MP10 producida por <i>Pseudomonas</i> sp. AU10	57
II.	Identificación del gen <i>mp10</i> y regiones flanqueantes	60

Obtención de una región parcial del gen.....	60
Secuencia codificante del gen y su contexto genético	61
III. Características de la metalo-proteasa MP10 (análisis in silico)	64
Identificación de aminoácidos catalíticos	64
Señales de secreción	65
Determinación del pro-péptido	66
Abundancia de aminoácidos implicados en la flexibilidad estructural.....	67
Búsqueda de regiones aminoacídicas con tendencia a la agregación proteica.....	68
IV. Producción recombinante de la proteasa MP10 en <i>E. coli</i>	70
Construcción del vector de expresión pMP10-H6.....	70
Evaluación de distintas cepas de <i>E. coli</i> para la producción de MP10.....	71
Inducción de la expresión de MP10 a 12 °C.....	75
V. Producción y purificación de MP10 a partir de los cuerpos de inclusión	78
VI. Plegamiento in vitro de MP10 por el método de dilución rápida.....	80
VII. Purificación de MP10 recombinante	81
VIII. Caracterización parcial de MP10	83
Validación del ensayo de actividad proteolítica	83
pH óptimo	84
Efecto de la temperatura sobre la actividad de MP10	85
Inhibición de MP10 con EDTA.....	86
IX. Producción y purificación de la proteasa MP10 nativa a partir del cultivo de <i>Pseudomonas</i> sp. AU10.....	87
X. Espectros de dicroísmo circular (DC) de MP10 nativa y recombinante.....	91
Discusión	93
Identificación de la proteína MP10 y su gen codificante.....	93
Producción recombinante de MP10	100

Purificación de MP10 y caracterización parcial de la enzima	104
Producción de la enzima nativa	107
Consideraciones generales	109
Conclusión y perspectivas	111
Bibliografía	113
Anexo I	128
Anexo II	129
Anexo III	130
Anexo IV	132

Resumen

Los microorganismos, con su gran diversidad bioquímica y metabólica, han colonizado todos los nichos del planeta y son capaces de sobrevivir en ambientes con condiciones extremas. Tal es el caso del continente Antártico, el continente más frío, seco y ventoso del planeta, en el cual la temperatura puede alcanzar los -90°C . Parte de los mecanismos de adaptación que los microorganismos han desarrollado para habitar este tipo de ambientes es sintetizar enzimas activas a estas temperaturas (enzimas psicrófilas), que les permiten sostener su metabolismo a bajas temperaturas. En general, las enzimas psicrófilas presentan (en comparación con las enzimas provenientes de organismos mesófilos) una elevada eficiencia catalítica (k_{cat}/K_M) a bajas temperaturas, así como una menor estabilidad térmica, inactivándose fácilmente a temperaturas moderadas. Desde un punto de vista tecnológico, estas enzimas son interesantes candidatas para su utilización en productos o procesos industriales que requieran enzimas que funcionen a bajas temperaturas, condiciones donde las enzimas mesófilas no son eficientes catalizadores.

Pseudomonas sp. AU10, un aislamiento bacteriano colectado en la isla Rey Jorge de la península Fildes, Antártica, AU10 produce una enzima proteolítica extracelular (capaz de hidrolizar proteínas lácteas a temperaturas bajas y moderadas) con

potenciales aplicaciones en distintas industrias. Durante esta tesis de Maestría se identificó el gen codificante de la proteasa (y su contexto genómico), se produjo la enzima recombinante en *Escherichia coli* y la misma se caracterizó parcialmente a nivel bioquímico y molecular. La enzima es una metalo-proteasa alcalina, extracelular, perteneciente a la familia de las metzincinas, con características propias de enzimas siccófilas. Se determinó que AU10 produce y secreta la enzima durante la fase exponencial temprana cuando el microorganismo crece a baja temperatura. Se realizó también la purificación de la enzima nativa, desde el sobrenadante de cultivo de AU10, y ambas enzimas, recombinante y nativa, se compararon a través de sus espectros de dicroísmo circular, mostrando que no existirían diferencias significativas entre ambas.

Introducción

I. Enzimas proteolíticas

Generalidades

Las proteasas son enzimas que catalizan la degradación de proteínas al hidrolizar los enlaces peptídicos. De acuerdo al criterio adoptado por el Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular, en el cual las enzimas se clasifican en grupos dependiendo de la reacción que catalizan, las proteasas pertenecen al Grupo 3 (hidrolasas), subgrupo 4. Estas enzimas se encuentran presente en todos los organismos vivos cumpliendo diversas funciones a nivel celular. Sus funciones abarcan desde los procesos generales de digestión de las proteínas de la dieta hasta procesos específicos y muy regulados, como la activación de zimógenos y modulación de la liberación de hormonas y otros productos bioactivos. Como consecuencia de sus diversas funciones y niveles en los que actúan, las proteasas tienen influencia en procesos de vital importancia como la proliferación y diferenciación celular, morfogénesis tisular, tratamiento de proteínas mal plegadas, neurogénesis, coagulación, procesos inflamatorios, homeostasis y apoptosis celular, entre otros. De hecho, algunas alteraciones en los sistemas proteolíticos están implicadas en la aparición de varias condiciones patológicas como el cáncer, enfermedades neurodegenerativas, enfermedades

inflamatorias y cardiacas (Parahuleva et al. 2013; Aggarwal & Sloane, 2014; Giuffrida et al. 2014; Thomas et al. 2014; Vassar et al. 2014 Xu et al. 2014).

En los vegetales, las proteasas también son de gran importancia para el procesamiento, maduración y/o eliminación de proteínas implicadas en diferentes etapas del desarrollo, la senescencia o proteínas sintetizadas en respuesta a estrés causado por el cambio en las condiciones ambientales (Roberts et al. 2012; Adam 2013; Nath et al. 2013)

Los microorganismos también producen una gran variedad de enzimas proteolíticas, muchas de ellas con fines nutricionales. La degradación proteica comienza a nivel extracelular produciendo aminoácidos y péptidos de hasta 35 aminoácidos, lo que pueden utilizarse como nutrientes. A su vez, muchos microorganismos infecciosos, como los patógenos oportunistas, producen y secretan proteasas como factores de virulencia que les facilitan la colonización de diferentes nichos. Un ejemplo muy conocido es *Pseudomonas aeruginosa*. Esta bacteria produce y secreta varios factores de virulencia, entre ellos una proteasa alcalina (degrada varias proteínas asociadas a la inmunidad innata en vertebrados) y la elastasa (degradar las fibras elásticas de las paredes vasculares) (Nicas & Iglewski, 1985; Guzzo et al. 1991; Veessenmeyer et al. 2009).

Además de su papel esencial para el desarrollo de diversos procesos metabólicos y regulatorios, las enzimas proteolíticas son muy utilizadas a nivel industrial. En este sentido, las proteasas microbianas (debido a su mayor estabilidad, facilidad de manejo

y menor costo de producción) suelen preferirse frente a las enzimas de origen animal o vegetal. En 2013 el mercado de enzimas industriales valía cerca de US\$ 4.8 billones y la expectativa es que alcance los US\$7.1 billones para el año 2018 según el reporte de la BBC Research “Global Markets for Enzymes in Industrial Applications” (www.bbcresearch.com). Dentro del mercado global de enzimas, las proteasas son el grupo más representado y encuentran aplicaciones en la industria de detergentes, alimenticia, farmacéutica, textil, entre otras. Se calcula que el mercado mundial de proteasas representa el 60% del total de enzimas comercializadas.

Clasificación de proteasas

Originalmente las proteasas se clasificaron como endopeptidasas o exopeptidasas, indicando que el enlace peptídico blanco de hidrólisis es interno a la proteína, o próximo al extremo amino-terminal (aminopeptidasas) o carboxilo-terminal (carboxipeptidasas), respectivamente. Existe a su vez una clasificación basada en su mecanismo catalítico que permite distinguir cuatro clases principales de proteasas: i) serín-proteasas, ii) cisteín-proteasas, iii) proteasas aspárticas y iv) metalo-proteasas. Actualmente también se han descrito dos grupos poco representados de proteasas glutámicas y treonín-proteasas (Rao et al. 1998). A su vez, en base a su secuencia aminoacídica las proteasas pueden agruparse en familias. A su vez las familias homólogas (divergentes de un ancestro común) se

agrupan en clanes (Rawlings & Barrett, 1993). La base de datos MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk/>) es la mayor fuente de información sobre proteasas.

Serín-proteasas – Estas proteasas se caracterizan por presentar un residuo de serina (Ser) en su sitio activo, responsable del ataque nucleofílico sobre el carbonilo del enlace peptídico blanco. La mayoría de las serín-proteasas poseen en su sitio activo la llamada triada catalítica, compuesta por el residuo de Ser (nucleófilo del mecanismo catalítico), una histidina (His) (residuo básico que desprotona el tiol) y un aspartato (Asp) (grupo electrófilo) (Fig. 1a). También se han descrito serín-proteasas con triadas e incluso díadas catalíticas diferentes, incluyendo: Ser-His-Glu, Ser-Lys/His, His-Ser-His y Ser N-terminal (Hedstrom 2002). De acuerdo a la base de datos MEROPS, las serin-proteasas se pueden agrupar en clanes diferentes (actualmente 12) que agrupan distintas familias de peptidasas. La subtilisina Carlsberg producida originalmente por *Bacillus licheniformis* es la peptidasa modelo de uno de ellos (clan SB). Esta proteasa posee una amplia especificidad de sustrato, una temperatura óptima de 60 °C y se utiliza en formulaciones detergentes.

Cisteín-proteasas - Según la base de datos MEROPS los distintos grupos de cisteín-proteasas se agrupan en el clan CA y la proteasa modelo es la papaína, una proteasa extraída de la planta *Carica papaya*. Otro conjunto de proteasas muy estudiadas dentro de este grupo son las catepsinas lisosomales, las cuales son en

su mayoría cisteín-proteasas. Además de su implicancia en el recambio proteico, actualmente se conoce que estas proteasas están implicadas en diversas funciones específicas, tales como en el desarrollo de ciertas enfermedades cardiovasculares (Sjoberg & Shi, 2011) y cáncer (Tan et al. 2013). El mecanismo catalítico de las cisteín-proteasas involucra la formación de un intermediario enzimático acilado. El ataque nucleofílico se realiza a través del grupo tiol reactivo de una cisteína presente en el sitio activo. El tiol se transforma en un nucleófilo al desprotonarse gracias a un residuo de His adyacente (Fig. 1b) (Rao et al. 1998).

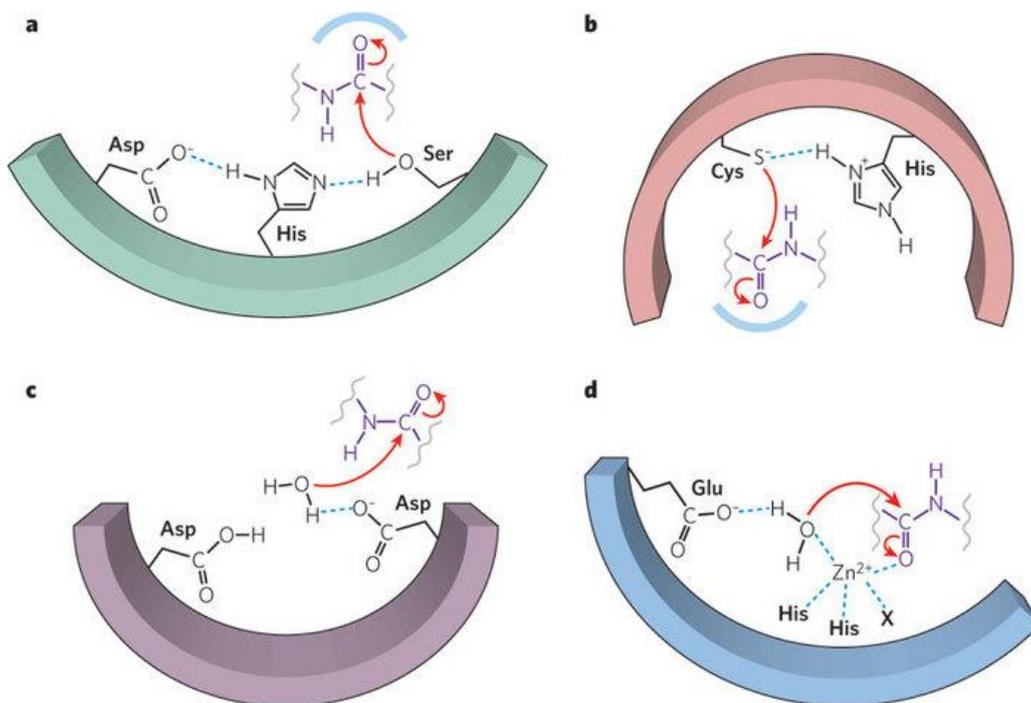


Figura 1. Mecanismo de acción de las proteasas serínicas (a), cisteínicas (b), aspárticas (c) y metálicas (d). Tomado de Neitzel JJ (2010).

Proteasas aspárticas - Estas proteasas (llamadas también proteasas acídicas) se caracterizan por poseer dos residuos de Asp altamente conservados en su sitio activo. En este caso, el grupo nucleofílico es una molécula de agua que se activa (desprotona) por el ataque de un Asp del sitio activo (Fig. 1c) (Rao et al. 1998). La gran mayoría de las proteasas aspárticas presentan una actividad máxima a valores de pH bajos (entre 3 y 4). Ejemplos de este tipo de proteasas lo constituyen la pepsina (proteasa que se puede encontrar en estómagos de básicamente todos los vertebrados, y que cumple funciones nutricionales) la renina, quimosina así como las catepsinas lisosomales D y E, entre otras. Las proteasas aspárticas también son producidas por diversos microorganismos. Muchas proteasas aspárticas, con capacidad coagulante de la leche, secretadas por diferentes especies de hongos (*Mucor pusillus* y *Mucor miehei* entre otros) son utilizadas a nivel industrial para el cuajado de quesos (Souza et al. 2001).

Metallo-proteasas – Las metalo-proteasas se caracterizan por presentar un ión catiónico en su sitio activo, que coordina una molécula de agua y el oxígeno carbonílico del enlace peptídico a atacar, siendo el ión metálico el responsable de activar la molécula de agua para transformarla en un nucleófilo (Fig 1d). Todas las metalo-proteasas comparten la característica de inhibirse por agentes quelantes, como el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), entre otros. El catión más frecuente en las metalo-proteasas es el ión zinc (Zn^{2+}), aunque también se han encontrado

enzimas capaces de utilizar otros metales de transición, como Co^{2+} y Mn^{2+} . En general, estos iones metálicos están ligados en el sitio activo formando una estructura tetraédrica, donde se encuentra coordinado por tres o cuatro residuos aminoacídicos cargados. La His es el residuo más frecuente en el sitio activo de este tipo de enzimas, seguida de Glu, Asp o Cys. Según el mecanismo catalítico de la enzima, el ión metálico es responsable de: i) la activación de la molécula de agua para que realice el ataque nucleofílico, ii) la polarización del carbonilo del enlace que se hidroliza y iii) la estabilización de intermediarios cargados negativamente en el estado de transición (Rao et al. 1998).

Las metalo-proteasas se dividen en dos grandes categorías, según el sitio de hidrólisis del enlace peptídico: metalo-exopeptidasas, si hidrolizan desde el extremo, o metalo-endopeptidasas si hidrolizan una región interna del sustrato proteico. La metalo-endopeptidasa modelo es la Termolisina (EC 3.4.24.27), una proteasa extracelular secretada por la bacteria *Bacillus thermoproteolyticus*; mientras que la Carboxipeptidasa A (EC 3.4.17.1) (hidrólisis del C-terminal de ésteres y péptidos con cadenas laterales grandes e hidrofóbicas) es la metalo-exopeptidasa modelo. Existe además una clasificación adicional para las proteasas metálicas, basada en la especificidad de su acción. En este sentido se diferencian cuatro grupos: i) metalo-proteasas neutras, con especificidad por aminoácidos hidrofóbicos, ii) metalo-proteasas alcalinas, que poseen una amplia especificidad de sustrato, iii) metalo-proteasas tipo Myxobacter I, que hidrolizan enlaces peptídicos

flanqueados por aminoácidos pequeños, ya sea en el lado N o C-terminal y iv) Myxobacter II, que hidrolizan enlaces peptídicos que tienen una lisina en el lado N-terminal (Rao et al. 1998). Un grupo de metalo-proteasas muy estudiado por su gran importancia para los seres humanos son las metalo-proteasas de matriz (MMPs del inglés *Matrix Metallo proteases*). Las mismas son endoproteasas dependientes de zinc, que hidrolizan los componentes proteicos de la matriz extracelular, participando en funciones relacionadas a la remodelación tisular (Stamenkovic, 2003) y que también están asociadas con el crecimiento y metástasis en diversos tipos de cáncer en humanos (Scherer et al. 2008; Kessenbrock et al. 2010).

Producción de proteasas por diferentes organismos - Aplicaciones industriales

Las enzimas proteolíticas son ubicuas y capaces de llevar a cabo reacciones muy específicas. Esta última característica las ha posicionado como enzimas muy atractivas para diferentes industrias. Las enzimas hidrolíticas representan el 75%, del mercado mundial de enzimas industriales, de los cuales el 60% corresponde a las proteasas (Shankar et al. 2011). El 10% restante corresponde fundamentalmente a las lipasas y celulasas.

Los microorganismos, debido a su gran diversidad fisiológica y bioquímica, y su susceptibilidad a ser genéticamente manipulados, constituyen la principal fuente de

enzimas proteolíticas. Estas enzimas tienen aplicaciones en diversos campos industriales, siendo la industria de detergentes y alimenticia sus principales mercados. A su vez, considerando las tendencias actuales de implementar tecnologías ambientalmente amigables, la utilización de enzimas proteolíticas se ha extendido a otras industrias. Algunos procesos químicos que usualmente se realizaban en condiciones de temperatura y pH extremos, o altas presiones, pueden realizarse por reacciones enzimáticas en condiciones más moderadas (Rao et al. 1998). Las enzimas presentan la ventaja de catalizar reacciones altamente específicas y tener elevada eficiencia catalítica, llevando a cabo incluso reacciones estero selectivas. La utilización de enzimas permite además disminuir el consumo energético y de agua en algunas industrias, así como generar menor cantidad de desechos y subproductos. Sumado a esto, actualmente es posible, mediante técnicas de mutación dirigida, mejorar la estabilidad y especificidad de los biocatalizadores para adecuarlos a los procesos productivos (Rao et al. 1998; Gupta et al. 2002).

Algunas de las aplicaciones industriales de las enzimas proteolíticas se detallan a continuación.

Industria del detergente - Las proteasas fueron por primera vez introducidas en la formulación de detergentes a finales de la década de 1960 y actualmente, junto con otras enzimas hidrolíticas (lipasas, amilasas, celulasas, oxigenasas y peroxidasas), son un ingrediente común de estos productos. De hecho, las proteasas para detergentes

representan el 25% del mercado mundial de enzimas para uso industrial. Se utilizan tanto en los detergentes para ropa, así como en soluciones de limpieza de lentes de contacto (Pawar et al. 2009) y prótesis dentales. La primer proteasa microbiana utilizada con este fin fue la alcalasa, extraída de *Bacillus licheniformis*, que formaba parte del detergente “BIOTOX” comercializado por Novo Ind A/S (actualmente Novozyme, la industria biotecnológica líder en producción y comercialización de enzimas industriales). La mayoría de las proteasas incluidas en los productos detergentes son del grupo de las subtilisinas (serin-proteasas alcalinas secretadas por las bacterias del género *Bacillus*), debido a que son activas en las condiciones fuertemente alcalinas de los mismos. Las proteasas utilizadas en este tipo de producto deben ser estables frente a las sustancias blanqueadoras y agentes oxidantes, así como compatibles con la fuerza iónica de la solución detergente (Gupta et al. 1999; Showell, 1999). Actualmente, existe un interés creciente por la identificación de proteasas alcalinas activas en un rango amplio de temperatura. Las proteasas con elevada eficiencia catalítica a temperaturas bajas y moderadas permiten el lavado con agua corriente, sin el calentado de la misma, lo que implica un ahorro en el consumo energético y un menor impacto ambiental (Binod et al. 2013).

Industria alimenticia - En la industria alimenticia la principal aplicación de las proteasas es en la elaboración de quesos, en donde su función es la coagulación de las proteínas lácteas, específicamente hidrolizando el enlace Phe₁₀₅-Met₁₀₆ de la k-caseína para dar

lugar a para-k-caseína y otros macropéptidos (Souza et al. 2001). Tradicionalmente, la proteasa utilizada para la fabricación de queso es la quimosina (EC 3.4.23.4) extraída de estómagos de terneros. No obstante, la gran demanda mundial por esta enzima, así como su elevado costo de producción, impulsó a la industria en la búsqueda de enzimas proteolíticas de origen microbiano para la industria láctea. Existen actualmente ciertas proteasas, producidas por microorganismos GRAS (de su sigla en inglés *Genetically Regarded As Safe*), que están reemplazando gradualmente a la quimosina. Entre los microorganismos GRAS que se utilizan con este fin se encuentran los de origen fúngico como *Mucor miehei*, *Mucor pusillus* Lindt y *Endothia parasítica* (García da Silveira et al. 2005). Si bien estas enzimas no presentan el mismo grado de especificidad que la quimosina bovina, son útiles para la producción de quesos de buena calidad. Existen también algunas proteasas de origen bacteriano utilizadas en la elaboración de quesos. Sin embargo, la falta de especificidad en la acción de ciertas proteasas bacterianas produce la aparición de péptidos amargos, que ocasionan sabores indeseables en el producto final. Controlar el grado de hidrólisis de las proteínas lácteas durante la elaboración de alimentos es un proceso difícil de obtener. No obstante, el uso de ciertas proteasas bacterianas es de gran utilidad para la maduración de ciertas variedades de quesos. Por ejemplo, estas proteasas se utilizan para la producción de la variedad Cheddar (US4690826 Haard et al 1987 A; Preetha & Boopathy, 1994) y otros quesos de lenta maduración, que requieren condiciones específicas de temperatura y humedad, y generan productos con sabores picantes.

Las proteasas también encuentran utilidad en otras aplicaciones de la industria alimenticia, como ser en el tiernizado (ablandamiento) de carnes. Por ejemplo, la papaína se utiliza en la industria cárnica debido a que es muy eficiente en la degradación de proteínas fibrosas y tejidos conectivos. También se emplean proteasas en la industria panadera para degradar el gluten, mejorando el ablandamiento y textura de la masa. Así mismo, las proteasas bacterianas alcalinas usualmente se emplean para la elaboración de hidrolizados proteicos de alto valor nutricional y mayor digestibilidad, utilizados por ejemplo en la formulación de alimentos para niños (Neklyudov et al. 2000).

Aplicaciones terapéuticas - Las proteasas también tienen aplicaciones clínicas. Diversas proteasas con acción fibrinolítica tienen potencial aplicación como agentes trombolíticos (Cho et al. 2004; Phan et al. 2011). La uroquinasa y la alteplasa (actualmente obtenidas en forma recombinante) son serín-proteasas, aisladas de cultivos de células renales humanas y glóbulos sanguíneos, respectivamente, que se utilizan como agentes fibrinolíticos (Nguyen & Ward, 1993). También existen formulaciones tópicas que incluyen proteasas con la finalidad de degradar tejidos necróticos en heridas superficiales. Tanto las proteasas derivadas de organismos mesófilos como las provenientes de organismos sicrofilos/sicrotolerantes son de utilidad en formulaciones tópicas, con efectos localizados (Kudrya & Simonenko, 1994; Fornbacke & Clarsund, 2013). Existe también evidencia que señala la efectividad del

uso de enzimas proteolíticas aisladas de krill Antártico para el tratamiento de heridas necróticas (Mekkes et al. 1998).

Industria textil - Las enzimas proteolíticas, con actividad queratinolítica y elastolítica, se utilizan para el tratamiento de fibras proteicas naturales, como la seda y la lana. Estas enzimas se utilizan con el fin de obtener una superficie de la tela o tejidos limpios y suaves, lo cual permite obtener productos con diferente acabado (Infante et al. 2010). Esta es una alternativa menos costosa que el procedimiento mecánico que generalmente se utiliza para este fin. Estas enzimas se utilizan también para la remoción del pelo y el ablandado del cuero, ofreciendo una tecnología de origen biológico que no contamina el medioambiente, a diferencia de lo que sucede con los tratamientos clásicos donde se utilizan compuestos con sulfuros (Rao et al. 1998; Gupta et al. 2002, Rani et al. 2012).

Tratamiento de desechos - Desde hace algunos años se están utilizando enzimas proteolíticas bacterianas para tratar los desechos domésticos y de industrias procesadoras de alimentos. Son útiles para degradar, por ejemplo, plumas (desechos de los mataderos de aves) y remover el pelo y otros residuos proteicos depositados en los drenajes, entre otros. Para esto se utilizan enzimas queratinolíticas, que son proteasas que hidrolizan los sustratos queratinosos (Dalev 1994). Por ejemplo, en nuestro país la empresa Enzur produce Biozur 10S, un preparado con proteasas y

amilasas de origen bacteriano para el tratamiento de plantas de efluentes y cañerías domésticas.

El éxito en la implementación de procesos enzimáticos radica en lograr el desarrollo de productos competitivos desde un punto de vista económico comparados con los productos químicos tradicionales ya establecidos. La exploración de la biodiversidad y la expansión de la búsqueda de enzimas con propiedades novedosas es de vital importancia para el continuo desarrollo de la tecnología enzimática.

II. Microorganismos adaptados al frío – fuente de enzimas novedosas

Aproximadamente el 85% de la biosfera presenta ambientes fríos, en donde la temperatura promedio es menor a 5 °C (Rodrigues & Tiedje, 2008; Margesin & Miteva, 2011) y que han sido colonizados exitosamente por una gran variedad de bacterias, arqueas, hongos filamentosos, levaduras y algas (Satyanarayana et al. 2005; Gonçalves et al. 2012; Godinho et al. 2013; Dan et al. 2014). Los microorganismos que han colonizado exitosamente estos ambientes fríos son psicrófilos y psicrotolerantes. De acuerdo a la definición de Morita (1975), los microorganismos psicrófilos son aquellos que tienen temperaturas óptimas de crecimiento menores a 15 °C y máximas no mayores a 20 °C; mientras que los microorganismos psicrotolerantes son aquellos capaces de crecer a 0 °C pero con temperaturas óptimas de crecimiento en el rango de 20 a 40 °C. Por otra parte aquellos microorganismos con temperaturas óptimas de

crecimiento próximas a 35 °C son definidos como mesófilos. La capacidad de los microorganismos psicrófilos y psicrotolerantes de crecer y dividirse en ambientes con temperaturas bajas radica en su habilidad para superar dos dificultades principales: i) el decaimiento exponencial en la velocidad de las reacciones bioquímicas y ii) el aumento en la viscosidad de los ambientes acuosos (D'Amico et al. 2002; 2006). Por estos motivos, estos microorganismos han desarrollado diversos mecanismos de adaptación que incluyen: i) la modificación de la composición lipídica de la membrana plasmática, para evitar la pérdida de fluidez, ii) la síntesis de proteínas y otras moléculas anti-congelamiento, iii) adaptación y sobre-expresión de las proteínas que participan en los procesos de transcripción y traducción (por ejemplo factores de transcripción, proteínas tipo histonas, ADN girasas, ARN helicasas entre otras), iv) síntesis de exopolisacáridos protectores, y v) síntesis de enzimas adaptadas a bajas temperaturas (enzimas psicrófilas) que les permitan sostener el metabolismo celular y la producción de energía en estas condiciones (D'Amico et al. 2006; Pikuta & Hoover, 2007; Martínez-Rosales et al. 2012; Jung et al. 2014).

III. Enzimas adaptadas a las bajas temperaturas

Desde hace tiempo el estudio de enzimas activas a las bajas temperaturas ha captado la atención de la comunidad científica debido a que estas enzimas proporcionan un modelo para comprender los fenómenos de la estabilidad térmica y adaptación

molecular de las proteínas. Asimismo, sus características las han vuelto muy atractivas por su potencial utilización en la industria biotecnológica.

En general las enzimas activas a bajas temperaturas presentan – en comparación con las enzimas provenientes de organismos mesófilos – tres características distintivas: i) mayor actividad específica (k_{cat}^1) o eficiencia catalítica (k_{cat}/K_M^2) a bajas temperaturas, ii) una temperatura óptima de actividad catalítica más baja y iii) menor estabilidad térmica, siendo en general fácilmente inactivadas a temperaturas moderadas y por agentes desnaturizantes (D'Amico et al. 2003; Struvay & Feller, 2012; Joshi & Satyanarayana, 2013). La obtención de estructuras cristalográficas de proteínas psicrófilas y su comparación con homólogas mesófilas ha permitido comprender en parte los mecanismos de adaptación de estas proteínas (Arpigny et al. 1993; Dong et al. 2005; Violot et al. 2005; Wang et al. 2007; Michaux et al. 2008; Almog et al. 2009; Zhang et al. 2011). Se ha propuesto que el aumento en la actividad catalítica a baja temperatura está asociado con un incremento en la flexibilidad de la estructura proteica, ya sea en su totalidad o en una región puntual de la proteína (Aghajari et al. 1998a; Petegem et al. 2003, Johns & Somero, 2004; D' Amico et al. 2006; Zhang et al. 2011; Feller, 2013). En muchos casos se ha constatado que la inactivación de estas enzimas activas en frío se da a temperaturas menores a la temperatura de desnaturización. Se entiende que existe un compromiso entre la estabilidad térmica y

¹ k_{cat} es la constante catalítica o número de recambio. Representa el número máximo de moléculas de sustrato que se convierten en producto, por unidad de sitio activo, por unidad de tiempo.

² k_{cat}/K_M es la constante de especificidad catalítica que permite comparar la eficiencia catalítica de diferentes enzimas.

la actividad catalítica, de modo que las enzimas han evolucionado ajustando el número y la fuerza de las interacciones estabilizantes para optimizar el balance entre la rigidez (necesaria para la estabilidad estructural) y la flexibilidad requerida para una eficiente actividad catalítica a baja temperatura (Arnold et al. 2001). Si bien existen algunos indicios de cuáles son los posibles mecanismos estructurales que permiten que se produzca esta elevada actividad catalítica a baja temperatura, no existen características estructurales comunes que se puedan generalizar a todas las enzimas activas en frío (Sheridan et al. 2000; Aghajari et al. 2003).

Algunos elementos que se han encontrado al analizar la estructura de distintas enzimas activas en frío son: i) la existencia de bucles superficiales más abiertos, ii) una mayor cantidad de residuos polares expuestos en la superficie de la proteínas, en contacto con el solvente, o la presencia de núcleos proteicos menos hidrofóbicos, iii) una disminución de la cantidad de puentes salinos, iv) la presencia de hélices alfa menos estabilizadas y en consecuencia enlaces de hidrógeno más débiles (Villeret et al. 1997; Brunialti et al. 2011; Zhang et al. 2011). En algunos casos se piensa que la presencia de aminoácidos específicos se ha convertido en elementos claves para la adaptación al frío en estas enzimas (Marx et al. 2007). La glicina es un residuo importante para mejorar la flexibilidad de la estructura proteica, pues su presencia proporcionaría una mayor amplitud para los movimientos relativos entre los elementos de la estructura secundaria. Por otro lado, al analizar las secuencias de proteínas bacterianas antárticas, Grzymiski et al. (2006) constataron una reducción

significativa en el contenido de Pro, disminución del número de agrupamientos de residuos hidrofóbicos, así como en el número de residuos implicados en la formación de puentes salinos (Arg, Glu y Asp). La disponibilidad de un mayor número de secuencias de genomas de microorganismos psicrófilos es crucial para contribuir al conocimiento de los mecanismos de adaptación de las proteínas a un ambiente frío.

IV. Proteasas activas a bajas temperaturas - potencial tecnológico

Las enzimas proteolíticas psicrófilas resultan interesantes desde un punto de vista tecnológico. Estas tienen el potencial de ser utilizadas en procesos industriales, que por sus características o por la inestabilidad de los productos generados, deban realizarse a bajas temperaturas de reacción ; siendo además fácilmente inactivadas con tratamientos térmicos moderados (Ohgiya et al. 1998; Kasana, 2010; Joshi & Satyanarayana, 2013). Se han aislado varios microorganismos psicrófilos y psicrotolerantes productores de proteasas activas a bajas temperaturas, bacterias Gram negativas como Gram positivas (Kulakova et al. 1999; Chessa et al. 2000; Koka et al. 2000; Secades et al. 2001; Wang et al. 2005; Yuan & Hayashi, 2009; Wan et al. 2010; Tariq et al. 2011; Saba et al. 2012), así como levaduras (Ray et al. 1992; Turkiewicz et al. 2003) y hongos (Damare et al. 2006; Zhu et al. 2009). La **Tabla 1** recopila

información referente a los distintos trabajos sobre la producción y caracterización de proteasas activas a bajas temperaturas producidas por microorganismos.

Tabla 1. Algunos microorganismos productores de proteasas activas a bajas temperaturas

Microorganismo	Características de la proteasa			Clasificación	Referencia
	Temperatura óptima (°C)	pH óptimo	Otras		
<i>Candida humicola</i>	37	10	Activa entre 0 – 45°C	Proteasa ácida inhibida por pepstatina	Ray et al. 1992
<i>Flavobacterium YS-80</i>	30	8.5	-	Metalo proteasa	Wang et al. 2010
<i>Planomicrobio sp. 547</i>	35	9	Activa entre 10 – 60°C	Proteasa alcalina, tipo subtilisina	Sheng et al. 2011
<i>Pseudomonas sp. Ele-2</i>	40	-	Activa entre 10 – 60°C	Metalo proteasa	Vazquez et al. 2004
<i>Pseudomonas sp</i>	20	9-10	-	Metalo proteasa alcalina	Chessa et al. 2000
<i>Serratia marcescens AP3801</i>	40	8.0	Activa entre 5 – 55°C	Metalo proteasa	Tariq et al. 2011
<i>Colwellia sp. NJ341</i>	35	8-9	30% actividad residual a 0°C	Serín proteasa	Wang et al., 2005
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	35	5	Activa entre 15 – 55°C	Metalo proteasa ácida	Koka et al. 2000
<i>Pseudomonas cepa DY-A</i>	40	10	60% actividad residual a 25°C	Serín proteasa alcalina	Zeng et al. 2003
<i>Pseudomonas aeruginosa MTCC 7926</i>	40	9	Activa entre 25 – 65°C	Proteasa alcalina	Patil et al. 2011
<i>Pseudomonas lundensis</i>	30	10.5	-	Metalo proteasa alcalina	Yang et al. 2010
<i>Pseudoalteromonas sp. D12-004</i>	35	7-8	Activa entre 5 – 65 °C	Metalo proteasa	Xiong et al. 2007

Adaptada de Joshi & Satyanarayana, 2013

Actualmente existen productos comerciales que emplean proteasas activas a bajas temperaturas. Tal es el caso de Kannase®, una proteasa activa entre 10-20 °C, que forma parte de los componentes activos de un detergente eficiente a temperatura ambiente; y Savinase®, una proteasa alcalina activa a temperaturas moderadas (45-50 °C), entre otras (Margesin 2009). De hecho, ya se han otorgado patentes para varias proteasas activas a bajas temperaturas provenientes de bacterias sicrofilas y

sicrotolerantes (Hasan & Tamiya, 1997; 1998; Takaiwa et al. 1997; Brenchley et al. 2001). Estas proteasas son particularmente útiles para la limpieza de tejidos sintéticos que no toleran temperaturas mayores a 50-60 °C y por ende requieren de tratamientos a menor temperatura, tanto a nivel doméstico como industrial.

V. La Antártida- fuente de recursos genéticos para la biotecnología

La Antártida es un continente que se caracteriza por estar geográfica y climáticamente aislado, y en su mayor parte no ha tenido influencia antropogénica. Tiene una amplia diversidad de ambientes acuáticos desde los mares e hielos marinos, hasta un gran número de lagos con salinidad variable. Todos estos ambientes experimentan condiciones ambientales extremas como aridez, grandes fluctuaciones de temperatura, frío extremo, y altas dosis de radiación solar. Las zonas costeras más septentrionales, como la península Antártica, islas adyacentes e islas subantárticas presentan un clima de tundra, donde la temperatura promedio del verano apenas superan los 0 °C, y en invierno se aproximan a -10 °C. Todas estas condiciones imponen dificultades al desarrollo de la vida. No obstante se ha comprobado que existe una gran diversidad microbiana (Cowan et al. 2014) capaz de ser explotada con fines biotecnológicos.

VI. Antecedentes y justificación

Nuestro grupo de investigación ha trabajado en el aislamiento de bacterias Antárticas productoras de enzimas proteolíticas y laccasas. Actualmente, el laboratorio cuenta con una colección de aislamientos de microorganismos Antárticos capaces de producir proteasas extracelulares cuando crecen a temperaturas bajas, con actividad proteolítica tanto a 4 como a 30 °C. Los mismos fueron identificados como pertenecientes a uno de los siguientes géneros: *Pseudomonas*, *Flavobacterium* o *Janthinobacterium* y se ha comprobado su capacidad de hidrolizar gelatina y proteínas lácteas (Martínez-Rosales & Castro-Sowinski, 2011). Uno de estos aislamientos, identificado por secuenciación del gen que codifica ARN ribosomal r 16S como perteneciente al género *Pseudomonas*, se denominó como *Pseudomonas* sp. AU10. AU10 es capaz de crecer entre 4 y 30 °C, con una temperatura óptima de crecimiento próxima a 20 °C, por lo cual se lo definió como una bacteria sicrotolerante. El mismo fue objeto de una tesis de Maestría, donde se estudió sus mecanismos bioquímicos y fisiológicos de adaptación a las bajas temperaturas, y actualmente se cuenta con alguna información que ha permitido avanzar en el conocimiento sobre su forma de vida a bajas temperaturas. Por estos motivos, AU10 se seleccionó para avanzar en el trabajo de caracterización de proteasas extracelulares.

En el marco de esta tesis nos hemos propuesto identificar el gen responsable de la síntesis de la proteasa extracelular producida por dicho aislamiento de *Pseudomonas*,

producir la proteasa en forma recombinante en un sistema heterólogo y posteriormente realizar la caracterización bioquímica de la enzima.

Si bien la proteasa en estudio es una proteína de secreción (lo que representa una ventaja importante para el posterior proceso de purificación), su expresión solo se detectó luego de varios días de crecimiento de *Pseudomonas* sp. AU10 a baja temperatura (Martínez-Rosales & Castro-Sowinski, 2010). De hecho, se ha informado que en muchos microorganismos psicrófilos la temperatura donde se obtiene el mayor rendimiento de producción de enzimas extracelulares es menor a la temperatura óptima de crecimiento del microorganismo (Margesin 2009). Sumado a esto, los microorganismos psicrófilos/psicrotolerantes no suelen ser buenos candidatos para utilizar en procesos de fermentación a escala industrial, ya que mantener sistemas de fermentación a bajas temperaturas por largos periodos genera un elevado costo energético. En el caso particular del aislamiento bacteriano *Pseudomonas* sp. AU10, con el cual se realiza este trabajo, se debe considerar además el hecho de que existen especies de *Pseudomonas* que son patógenos oportunistas, lo que puede generar controversias a la hora de producir una proteína con aplicaciones industriales. Por estos motivos, durante este proyecto se plantea la conveniencia de producir de forma recombinante la proteasa en estudio, en un microorganismo cuyo contexto genético sea conocido y que se utilice comúnmente para la producción industrial de proteínas recombinantes.

Aproximadamente el 90% de las enzimas industriales que se comercializan son versiones recombinantes de las mismas (Adrio & Demain, 2014). El microorganismo hospedero de elección para la expresión de proteínas recombinantes, con fines productivos a gran escala y a bajo costo, es *Escherichia coli*. En comparación con otros sistemas de expresión, *E. coli* presenta la ventaja de ser un microorganismo fácil de cultivar, con el cual se logra una rápida acumulación de biomasa y que permite en general escalar los procesos de fermentación sin grandes dificultades (Pryor & Leiting, 1997; Sorensen & Mortensen, 2005a; Chen, 2011). Sin embargo, es común que en las condiciones óptimas para el crecimiento de la bacteria, las proteínas expresadas en forma recombinante no son capaces de plegarse correctamente, resultando en la formación de agregados insolubles denominados cuerpos de inclusión. Los cuerpos de inclusión suelen estar formados principalmente por agregados de la proteína recombinante incorrectamente plegada y en general sin actividad biológica. Generalmente la reacción de agregación se ve favorecida a temperaturas elevadas, debido a la fuerte dependencia entre la temperatura y las interacciones hidrofóbicas que determinan la agregación (Sorensen & Mortensen, 2005b). En algunos casos se puede mejorar la solubilidad de estas proteínas con tendencia a formar agregados cultivando el microorganismo a temperaturas sub-óptimas para el crecimiento (Sorensen & Mortensen, 2005b).

El caso particular de la expresión recombinante de proteasas supone una dificultad adicional ya que existe la posibilidad de que la proteasa ha expresar resulte tóxica

para la célula hospedera, generando una disminución en la tasa de crecimiento - y ausencia de la proteína blanco- u ocasionando la lisis del cultivo directamente. No obstante en la literatura aparecen ejemplos de proteasas producidas en diferentes sistemas de expresión. Algunas proteasas activas en frío ya se han producido de forma recombinante utilizando diferentes estrategias de producción. En la Tabla 2 se resume alguna información reportada en la bibliografía sobre proteasas activas a bajas temperaturas producidas en forma recombinante.

Tabla 2. Ejemplos de proteasas activas a bajas temperaturas producidas de forma recombinante

Proteasa	Fuente	Hospedero	Vector de expresión	Recuperación de la enzima	Referencia
Tripsina	Krill antártico	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) <i>E. coli</i> TB1	pET22b(+) pMAL-c2E	Cuerpos inclusión soluble y activa	Olivera-Nappa et al. 2013
Serín-proteasa	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. st 2-10	<i>E. coli</i> BL21	pET22b(+)	Enzima activa en el sobrenadante del cultivo	Acevedo et al. 2013
Proteasa	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. QI-1	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	pCOLDIII	Enzima soluble sin actividad biológica	Xu et al. 2011
Proteasa	<i>Pseudoalteromonas halolanktis</i> TAC125	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	pET22b(+)	Cuerpos de inclusión Plegamiento <i>in vitro</i>	De Pascale et al. 2010
Oligopeptidasa B (“serin like protease”)	<i>Pseudoalteromonas</i> sp SM9913	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	pET22b(+)	Enzima soluble. Tag 6xHis	Yan et al. 2009
Tripsina activa en frío	Bacalao Atlántico (<i>Gadus morhua</i>)	<i>E. coli</i> TOP10	pThioHis A	Enzima soluble. Fusión a Trx	Jónsdóttir et al. 2004
Serín-proteasa	<i>Vibrio</i> sp. PA44 sicrotolerante	<i>E. coli</i> TOP10	pBAD-TOPO	Enzima soluble y activa	Arnórsdóttir et al. 2002
Serín-proteasa alcalina	<i>Shewanella</i> Ac10	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	pET21a	Cuerpos de inclusión Plegamiento <i>in vitro</i>	Kulakova et al. 1999

En algunos casos la obtención de enzima en forma soluble y activa se logró mediante plegamiento *in vitro* de la proteína (Kulakova et al. 1999; De Pascale et al. 2010);

Acevedo et al. (2013) lograron obtener la serín-proteasa de en el sobrenadante del cultivo bacteriano utilizando una estrategia de exportación de la enzima hacia el espacio periplasmático (utilizando el péptido señal de secreción pelB presente en los vectores de la serie pET). Otros autores han logrado mejorar la solubilidad de proteasas recombinantes expresadas en forma intracelular utilizando fusiones con proteínas como tiorredoxina o MBP (del inglés “*maltose binding protein*”). En este sentido Jónsdóttir et al. (2004) lograron obtener de forma soluble una proteasa con actividad de tripsina al expresarla fusionada con HP-tiorredoxina en el extremo N-terminal; mientras que Olivera-Nappa et al. (2013) consiguieron producir MBP-tripsina de krill antártico soluble en *E. coli*. En ambos casos se clonó y expresó el zimógeno inactivo de la enzima, que se activó luego de su purificación, utilizando cantidades mínimas de la enzima nativa.

OBJETIVOS

Objetivo general:

El objetivo de esta tesis es aislar y caracterizar la proteasa producida por el aislamiento Antártico *Pseudomonas* sp. AU10.

Objetivos específicos

- 1- Identificar el gen codificante de la proteasa extracelular producida por el aislamiento *Pseudomonas* sp. AU10.
- 2- Producir la proteasa en forma recombinante en *E. coli*.
- 3- Purificar y realizar una caracterización bioquímica parcial de la enzima. Realizar una caracterización *in silico* de la enzima y su contexto.
- 4- Producir y purificar la proteasa en forma nativa, a partir del sobrenadante de cultivo de *Pseudomonas* sp. AU10, para su comparación con la enzima recombinante.

Materiales y Métodos

I. Cepas y plásmidos utilizados en este trabajo

En este trabajo se utilizó el aislamiento antártico sicrotolerante *Pseudomonas* sp. AU10 (Martínez-Rosales & Castro-Sowinski, 2011). Este aislamiento se cultivó en medio LB, ML y PFm (Anexo I) a 7 y 20 o 30 °C, con 200 rpm de agitación constante. *Escherichia coli* DH5α se utilizó para realizar la propagación de plásmidos. Para los ensayos de expresión se utilizaron las siguientes cepas de *E. coli*: BL21, C41, C43 y C41/pDIA17. Los cultivos de *E. coli* se realizaron rutinariamente en medio LB, suplementado con 0.1 mg/ml de ampicilina (Amp). Para el caso de *E. coli* C41-pDIA17 se utilizó LB suplementado con Amp y 0.034 mg/ml de cloranfenicol (Cm). Los diferentes plásmidos utilizados en este trabajo se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Plásmidos

Plásmido	Característica	Resistencia	Fuente / Referencia
pTZ57R/T	Vector para clonado y secuenciado de fragmentos de amplificación de ADN	Amp ^R	InsTAcone PCR cloning kit, Fermentas, Cat.K1213
pET22b(+)	Vector de expresión	Amp ^R	Promega
pMP10-H6	pET22b(+) portando la región codificante de MP10	Amp ^R	Este trabajo
pDIA17	Derivado de pACYC184, portando el gen <i>lacI</i> actuando bajo el control del promotor del gen de tetraciclina	Cm ^R	Munier et al, 1991

II. Identificación de la proteasa MP10 de Pseudomonas sp. AU10 en el sobrenadante del cultivo

Crecimiento de AU10 y análisis del sobrenadante de cultivo

Una colonia fresca del aislamiento de *Pseudomonas* sp. AU10 se cultivó en 5 ml de medio LB (temperatura ambiente y 200 rpm) hasta fase exponencial, y 50 µl de cultivo se utilizaron para inocular 5 ml de medio ML y LB diluido 20 veces. Ambos cultivos se incubaron a 4 °C y 200 rpm durante 7 días. Una vez clarificado el cultivo en medio ML (coagulación de proteínas lácteas), se centrifugó a máxima velocidad durante 10 minutos a 4 °C para sedimentar las células y parte de las proteínas coaguladas. El sobrenadante se filtró utilizando un filtro de 0.22 µm (sobrenadante libre de células) y se analizó por electroforesis SDS-PAGE. La SDS-PAGE se realizó en un gel de poliacrilamida (gel concentrador al 5% y separador al 12%) (Anexo II). Las muestras se diluyeron en tampón de carga (Anexo III), se incubaron a 95 °C durante 5 minutos, se enfriaron en hielo y se sembraron 15 µl de muestra por pocillo. La corrida electroforética se realizó a 90V en tampón de corrida Tris-glicina (Anexo III) hasta que las muestras entraron en el gel separador y luego se aumentó el voltaje a 120V. Las bandas proteicas se revelaron con una solución colorante de Coomasie Brilliant Blue R-250 y se decoloró con solución decolorante (Anexo III).

Actividad proteolítica en el sobrenadante de cultivo

Hidrólisis de proteínas lácteas - Una alícuota de 100 µl del sobrenadante libre de células de *Pseudomonas* sp. AU10 se sembró en forma de una gran gota sobre una placa de medio ML-agar. La placa se incubó a 4 °C durante 16 hs. Se verificó la capacidad del sobrenadante de hidrolizar las proteínas lácteas por la producción de un halo de transparencia alrededor de la alícuota sembrada.

Zimograma - El número de proteínas con actividad proteolítica se analizó en un gel de actividad o zimograma. Durante el mismo se realizó la separación de fracciones proteicas en un gel de poliacrilamida en forma nativa (sin el agregado de detergentes, como SDS, ni agentes reductores) co-polimerizado con gelatina (Type B: *from bovine skin*, SIGMA). El gel de poliacrilamida consistió de un gel separador al 8% y gel concentrador al 5% (Anexo III). Se utilizó Tris-glicina pH 8.3 como tampón de corrida (Anexo III). Las muestras se diluyeron con el tampón de muestra sin SDS, ni β-mercapto etanol (Anexo III), se sembraron 10-15 µl por pocillo y se realizó la electroforesis a 180V durante 30 minutos. Finalmente, el gel se lavó una vez con Tritón-X100 al 1% durante 30 min, y dos veces con agua milliQ durante 5 min. Posteriormente, el gel se incubó a 4 y 30 °C en tampón PBS (Anexo III) durante 16 h para permitir la acción de la proteasa sobre la gelatina. Para el revelado, el gel se incubó en solución colorante de Coomassie Brilliant Blue R-250 y se destiñó con solución decolorante. La presencia de bandas de transparencia evidencia la acción proteolítica.

Identificación de la proteasa por espectrometría de masas EM-MALDI TOF

La banda proteica de aproximadamente 50kDa observada por SDS-PAGE se envió a la Unidad de Bioquímica y Proteómica Analítica (UByPA) del Instituto Pasteur, Montevideo, para su análisis por espectrometría de masas (EM).

El análisis se basa en la identificación de la proteína mediante un mapeo peptídico de la misma, mediante digestión trípica y obtención del espectro de masas utilizando el equipo 4800 MALDI/TOF/TOF de Applied Biosystems, en modo reflector. El equipo se calibra con un estándar de péptidos de Applied Biosystems. El perfil trípico se analiza utilizando el motor de búsqueda MASCOT del servidor NCBI nr.

III. Identificación del gen codificante de la proteasa MP10

Diseño de cebadores degenerados y amplificación de una región parcial del gen mp10

En base a la secuencia aminoacídica de los péptidos identificados por EM, se diseñaron cebadores degenerados (Tabla 4), que permitieran amplificar una región interna del gen codificante de la proteasa. El gen de la proteasa se denominó mp10. Para el diseño de cebadores se utilizó el programa Gene Runner. Como templado de la reacción de PCR se utilizó un lisado de *Pseudomonas* sp. AU10. La reacción de PCR se realizó en un termociclador Axygen modelo MaxyGene Gradient, en un

volumen final de 20 μl , conteniendo 2 μl de tampón de reacción 10X, 2 μl de una mezcla de dNTPs 2 mM, 1 μl de una solución 10 μM de cada cebador, 0.2 μl de Taq polimerasa (5 U/ μl ; SBS-Gentech), 3 μl del lisado celular y agua milliQ hasta completar el volumen. El ciclado consistió en una etapa de desnaturalización inicial a 95 °C, durante 5 min, seguido por 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 40 seg, hibridación de cebadores a 51.2 °C durante 1 min y extensión a 72 °C durante 1 min. Se realizó un ciclo final de extensión a 72 °C durante 5 min. El resultado de la reacción de PCR se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1% conteniendo 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ del colorante HGV-1 Goldview (SBS Gentech Ltda.). Se utilizó el tampón de corrida TAE 1X (Anexo III). El fragmento de ADN amplificado se purificó desde el gel de agarosa utilizando el kit “*Gel extraction kit*” (QIAGEN, Cat.28704) y se ligó en el vector pTZ57R/T (Tabla 1). Ambos ensayos se realizaron siguiendo las instrucciones del fabricante. La mezcla de ligación se utilizó para transformar, mediante choque térmico, células de *E. coli* DH5 α ultra-competentes (preparadas siguiendo el protocolo de Inoue et al., 1990). 5 μl de la mezcla de ligación se mezcló con 50 μl de células competentes, se incubó 30 min en hielo, luego 90 seg a 42 °C y finalmente 2 min en hielo. Inmediatamente se agregaron 400 μl de medio LB sin antibiótico, y las células se incubaron a 37 °C durante 1 hora con agitación constante. Se rastrilló luego 100 μl de la mezcla en placas de LB-Amp 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Las colonias transformantes que contenían el inserto se identificaron por PCR utilizando como templado de la reacción lisados celulares (se usó el ciclado descrito

antes y los cebadores degenerados). Se seleccionó el transformante y se extrajo el plásmido recombinante, utilizando el kit *Ron's plasmid mini kit* (BIORON, Cat.806942). El fragmento inserto se secuenció en el servicio correspondiente de Macrogen, Corea, utilizando los cebadores universales M13/pUC directo y reverso (Tabla 2). El análisis del cromatograma y edición de secuencia se realizó con el software BioEdit versión 7.0.

Para corroborar la secuencia obtenida se diseñaron cebadores específicos (directo E23 y reverso E422; Tabla 4) que se utilizaron para amplificar un fragmento de 400 pb. La amplificación se realizó utilizando la misma mezcla de reacción y el mismo ciclado que se utilizó con los cebadores degenerados, con la salvedad de que se usó como ADN molde el ADN genómico (ADNg) de *Pseudomonas* sp AU10. El ADNg se preparó utilizando el kit de extracción de ADN genómico de bacterias Gram-negativas de VIVO Science (Cat.VDG), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Obtención de la secuencia completa del gen mp10

La secuencia entera del gen codificante de la proteasa se completó utilizando una estrategia de PCR inversa (PCRI) (Figura 2). Durante la misma se utiliza como ADN molde fragmentos de ADNg de *Pseudomonas* sp. - obtenidos por digestión con enzimas de restricción - ligados sobre sí mismos. La amplificación se realiza a partir de cebadores que hibridan sobre una regiones internas de la secuencia conocida.

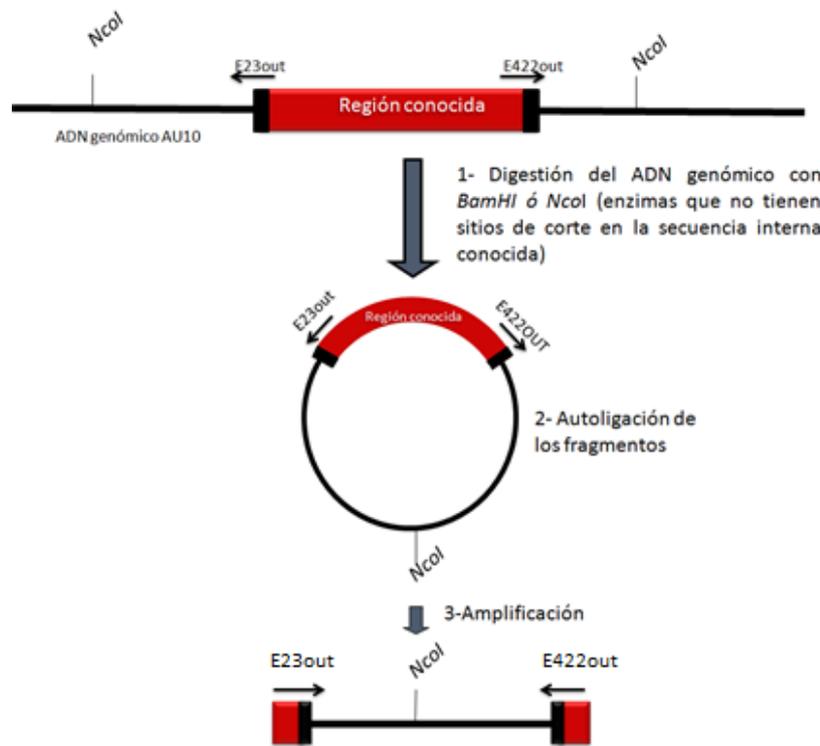


Figura 2. Representación esquemática de la estrategia de amplificación por PCR. E23out y E422out representan los sitios de hibridación de los cebadores utilizados en la reacción.

El ADNg de *Pseudomonas* sp AU10 se digirió con las enzimas de restricción *Bam*HI, *Eco*RI, *Eco*RV, *Nco*I, *Sac*I, y *Sal*I (Fermentas). Ninguna de estas enzimas tiene sitios de corte dentro de la secuencia parcial del gen (dilucidada en el punto anterior).

Las digestiones se realizaron en un volumen final de 20 µl, conteniendo 10 µl de ADNg (aproximadamente 1 µg de ADN), 2 µl de la enzima correspondiente, 2 µl del tampón de reacción 10X y 6 µl de agua, y se incubaron a 37 °C durante 16 hs. Las

enzimas de restricción se inactivaron calentado a 65 °C durante 20 min. La calidad de la digestión se verificó por electroforesis en geles de agarosa al 1%.

La ligación intramolecular de los fragmentos de ADN (autoligación) se realizó en un volumen final de reacción de 200 µl. Se mezclaron 10 µl de las digestiones, 20 µl de tampón de ligación 10X, 2 µl de T4 DNA Ligasa (Thermo Scientific, Cat. EL0014) y agua milliQ hasta el volumen deseado. Las reacciones se incubaron 16 hs a 4 °C. Luego de inactivar la ligasa por calentamiento, las autoligaciones se utilizaron como molde para la reacción de PCR. El diseño de los cebadores utilizados se realizó tomando los cebadores específicos E23 y E422, pero cambiando la orientación de los extremo 5' por 3', obteniendo los cebadores E23out y E422out (Tabla 2). La amplificación se realizó utilizando el "*RANGER Mix*" de BIOLINE (Cat. BIO-25051). Este es un mix que contiene una polimerasa de alta procesividad y con actividad correctora de prueba, específicamente diseñada para la amplificación de fragmentos largos de ADN. Se preparó la reacción en un volumen final de 25 µl, conteniendo 12.5 µl del mix Ranger 2X (conteniendo la polimerasa, dNTPs y MgCl₂ a una concentración final de 1.5 mM), 1.25 µl de una solución 10 µM de cada cebador, 3 µl de autoligación y agua milliQ hasta completar 25 µl. Se realizaron controles negativos conteniendo ADNg o agua, en lugar de la mezcla de autoligación. El ciclado consistió en una etapa de desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 min, seguido por 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 1 min, hibridación de

cebadores a 50 °C durante 1 min y extensión a 68 °C durante 1 min. Se realizó un ciclo final de extensión a 68 °C durante 6 min.

La presencia de productos de amplificación se analizó por electroforesis en gel de agarosa 1%. Los fragmentos amplificados se purificaron, clonaron en el plásmido pTZ57R/T y secuenciaron tal cual se indicó anteriormente. La secuencia nucleotídica se analizó utilizando la herramienta informática BLAST del servidor NCBI así como la base de datos de peptidasas MEROPS, y se reconstruyó la totalidad de la secuencia codificante de la metaloproteasa.

Tabla 4. Cebadores

Cebadores degenerados para amplificar una región parcial de mp10		
Nombre	Secuencia 5´-3´	Tm (°C)
Fwd_protAU101	GCNACNATGAAYAARCAYGG	--
Rev_protAU102	TTYTGDATNGCNGCDATRTCRTC	--
Cebadores específicos para amplificar una región interna de mp10		
Nombre	Secuencia 5´-3´	Tm (°C)
Fwd_AU10E23	TTCAGCCAGTTCAACACC	52.8
Rev_AU10E422	AGTAACTCATGACGCTGTAGC	54.5
Cebadores para la amplificación por PCR inversa		
Nombre	Secuencia 5´-3´	Tm (°C)
E23out	GGTGTGAACTGGCTGAA	52.8
E422out	GCTACAGCGTCATGAGTTACT	54.5
Cebadores para la amplificación de la CDS de MP10		
Nombre	Secuencia 5´-3´	Tm (°C)
Fw_mp10_p22	CGGGCATATGTCAAAGTAAAAGACAAAGC	58.6
Rev_mp10_p22	TAAATCTCGAGCGCTACGATGTCGCTGGC	64.8
Cebadores universales para secuenciación de fragmentos clonados en los diferentes vectores		

Nombre	Secuencia 5´-3´	Tm (°C)
T7 promotor	TAATACGACTCACTATAGGG	51
T7 terminador	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	46
M13/pUC	GTAAAACGACGGCCAGT	52
M13/pUC reverso	CAGGAAACAGCTATGAC	50

IV. Análisis in silico de la proteasa MP10

La secuencia codificante de mp10 fue analizada utilizando diferentes servidores y programas informáticos. El portal ExPASy (www.expasy.org) se utilizó para calcular el peso molecular y punto isoeléctrico de MP10 con la herramienta “Compute pI/Mw”. La búsqueda de posibles péptidos señales de secreción se realizó con el servidor SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). La herramienta BPROM del servidor Softberry (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml>) se utilizó para analizar la secuencia nucleotídica corriente arriba del sitio de inicio de la traducción.

V. Producción de la proteasa recombinante en E. coli

Construcción del vector de expresión pMP10-H6

La secuencia codificante de la proteasa MP10 se amplificó utilizando los cebadores específicos fw_mp10_p22 y rev_mp10_p22 (Tabla 4) que incorporan los sitios de restricción *NdeI* y *XhoI*, respectivamente (se señala subrayado sobre el cebador el sitio de corte correspondiente a las enzimas de restricción). En el cebador reverso se eliminaron las bases correspondientes al codón de terminación. Para la

amplificación se utilizó el “*RANGER Mix*” de BIOLINE. La reacción se describe en la sección anterior, en este caso se utilizó 1.25 µl de ADNg de *Pseudomonas* sp. AU10 como templado y agua milliQ hasta completar 25 µl. El ciclado consistió en una etapa de desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 min, seguido por 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 1 min, hibridación de cebadores a 63 °C durante 1 min y extensión a 68 °C durante 90 seg. Se realizó un ciclo final de extensión a 68 °C durante 5 min. El fragmento amplificado de 1458 pb se purificó desde el gel de agarosa 1%, se digirió con *NdeI* y *XhoI* (siguiendo las instrucciones del proveedor de enzimas) y se ligó entre los sitios *NdeI* y *XhoI* del plásmido pET22b(+) (previamente digerido con las mismas enzimas). La mezcla de ligación se utilizó para transformar por choque térmico células quimio-competentes *E. coli* DH5α. La presencia del inserto en los clones recombinantes (resistentes a Amp) se verificó por análisis de restricción; y la ausencia de mutaciones, así como la verificación de que el inserto se encontraba en fase se analizó por secuenciación utilizando los cebadores universales T7 que hibridan con el vector (Tabla 4). Se denominó al vector de expresión conteniendo el inserto de interés con el nombre pMP10-H6.

Transformación de las cepas de expresión

Todas las cepas de expresión de *E. coli* utilizadas en este trabajo se transformaron utilizando el protocolo de transformación por choque térmico de baja eficiencia,

según se describe a continuación. Se creció la cepa de expresión en medio LB, a 37 °C y 200 rpm durante 16 hs. 3 ml de cultivo se centrifugó a 2000 $\times g$ y 4 °C durante 3 min, se descartó el sobrenadante y el *pellet* de células se lavó dos veces en 0.5 ml de CaCl₂ 0.1 M frío. Las células se resuspendieron en 0.1 ml de CaCl₂ 0.1 M frío y se incubó en hielo durante 60 min. Se agregó 2 μ l de del vector de expresión (40 ng de ADN) y se realizó el choque térmico (30 min en hielo, 90 seg a 42 °C y 2 min en hielo). Se agregaron 400 μ l de medio LB y se incubó a 37 °C, con agitación (200 rpm) durante 1 h. Las células se rastrillaron en medio LB sólido con los antibióticos correspondientes para seleccionar los clones transformantes.

Producción de la proteasa MP10 en diferentes cepas de expresión de *E. coli*

El nivel de expresión de la proteasa se analizó en las cepas: *E. coli* BL21 (DE3), *E. coli* C41 y *E. coli* C43. Las tres cepas transformadas con el vector de expresión pMP10-H6 se crecieron en 5 ml de medio LB con 0.1 mg/ml de Amp, a 30 °C y agitación constante (200 rpm) durante 16 hs. Estos cultivos se utilizaron para inocular (inoculo al 1%) matraces conteniendo 100 ml de medio LB con Amp. Se controló la densidad óptica (DO) de los cultivos a 600nm, y al alcanzar un valor de DO entre 0.8 y 1 se agregó el inductor IPTG (en todos los experimentos de este trabajo se utilizó a concentración final 200 μ M). La inducción transcurrió durante 90 min. Las células se cosecharon centrifugando los cultivos a 2000 $\times g$ y 4 °C durante

10 min. Como control, el ensayo de expresión también se realizó con las cepas transformadas con el vector pET22b(+) sin el inserto mp10.

Expresión de MP10 en *E. coli* C41. Ensayo a baja temperatura

E. coli C41-pMP10-H6 se creció en medio LB a 37 °C según se describió en el punto anterior. El precultivo se desarrolló hasta alcanzar un valor de DO a 600 nm de aproximadamente 0.4, se incubó luego a temperatura ambiente durante 20 min y se termostató a 12 °C durante otros 20 min. Posteriormente, el cultivo se fraccionó en dos matraces de 250 ml conteniendo 50 ml de cultivo cada uno, y se agregó el inductor IPTG a uno solo de los mismos (cultivo inducido). El cultivo sin inducir, así como un cultivo de C41 transformado con el vector vacío (sin inserto), se utilizaron como controles en el ensayo. La inducción de la expresión de mp10 se dejó transcurrir durante 18 hs a 12 °C.

Ruptura y fraccionamiento celular

Tanto para la evaluación de las cepas de expresión como para el ensayo de inducción a baja temperatura, las células se cosecharon por centrifugación y se lavaron con tampón PBS. Los *pellet* celulares, normalizados a una DO a 600 nm de 2.5, se suspendieron en tampón Tris 1.5 M (pH 7.5) suplementado con sacarosa 0.5 M. A 0.4 ml de esta preparación se le agregó 50 µl de lisozima 2 mg/ml, preparada

en EDTA 0.1 M (pH 8), y se incubó a 4 °C durante 30 min. Las muestras se centrifugaron a 13790 *xg* durante 5 min y se separó el sobrenadante, correspondiente a la fracción periplasmática.

El *pellet* de esferoplastos se lavó, congeló a -20 °C, descongeló y sonicó (dos pulsos de 10 seg a 40% de potencia). Se centrifugó a 13790 *xg* y 4 °C durante 15 min y se separó el sobrenadante correspondiente a la fracción soluble. El *pellet*, correspondiente a la fracción de membrana y cuerpos de inclusión, se suspendió en 450 µl de agua milliQ y se analizó junto a la fracción soluble por SDS-PAGE.

En algunos casos se evaluó la actividad proteolítica de las fracciones realizando zimogramas incubados a 4 °C.

VI. Plegamiento in vitro de MP10 y purificación por cromatografía de afinidad a metales

Co-transformación de la cepa de expresión con el plásmido pDIA17 y el vector de expresión

Para mejorar el nivel de producción de la proteasa MP10, y evitar fenotipos de toxicidad, se transformó la cepa de expresión seleccionada, *E. coli* C41, con el vector pDIA17 (utilizando el protocolo de transformación por choque térmico de baja eficiencia) y se seleccionaron los clones transformantes creciendo las células en medio LB con Cm 0.034 mg/ml.

Producción y purificación de cuerpos de inclusión

Para producir los cuerpos de inclusión, un litro de medio LB suplementado con Amp se inoculó con 10 ml de un cultivo fresco de *E. coli* C41/pDIA17- pMP10-H6, se creció a 37 °C, hasta alcanzar una DO a 600nm entre 1.2 y 1.4, y se indujo la expresión de MP10 agregando IPTG (concentración final 200 µM). Las células se cosecharon por centrifugación luego de 90 min de inducción a 37 °C. El *pellet* de células se suspendió en 30 ml de tampón de lisis (Anexo III) frío, conteniendo lisozima (concentración final 0.2 mg/ml) y PMSF (concentración final 0.8 mM), se incubó en hielo por 15 min y luego se sonicó (nueve pulsos de 20 seg a 40% de potencia, con un minuto de descanso) utilizando el sonicador Sonic Ruptor 250, Omni International. La suspensión se centrifugó en una centrifuga Beckman JS-21 (rotor JA-20) a 1300 *xg* a 4 °C durante 5-10 min para sedimentar células que no se hubieran lisado. El sobrenadante se centrifugó nuevamente en la misma centrifuga y con el mismo rotor a 14610 *xg* y 4 °C durante 20 min. El sedimento insoluble se suspendió en 27 ml de tampón de lisis (Anexo III) frío, se agregó 3 ml de una solución de Triton-X100 al 10% y se incubó a 4°C durante 30 min, para promover la solubilización de los cuerpos de inclusión. Luego, se centrifugó en las mismas condiciones descritas en el paso previo y el *pellet* se suspendió en 2.5 ml de tampón de lisis (sin Triton). La completa desnaturalización de la proteína se logró agregando 2.16 g de urea (a temperatura ambiente y con agitación constante), obteniendo así 4.5 ml de una solución de cuerpos de inclusión en urea 8M. Para eliminar posibles

agregados que no se hubieran solubilizado totalmente, la preparación se centrifugó a la misma velocidad y tiempo anteriormente descritos, pero a temperatura ambiente. Esta preparación se utilizó inmediatamente para los ensayos de plegamiento *in vitro* de MP10.

Plegamiento *in vitro* de MP10 por el método de dilución rápida

El plegamiento de la proteasa MP10 se realizó por el método de dilución rápida de los cuerpos de inclusión en el tampón de plegamiento (Anexo III). El ensayo se realizó diluyendo 37.5 veces la preparación de cuerpos de inclusión en el tampón de plegamiento; el procedimiento permite pasar de una concentración de urea 8M a 0.2M. Los cuerpos de inclusión se agregaron por goteo al tampón de plegamiento previamente enfriado y con agitación. Una vez incorporados, se detuvo la agitación y se incubó a 4 °C durante 40 min. Se centrifugó a 14610 g para sedimentar agregados proteicos y la fracción resultante se analizó por SDS-PAGE y análisis de actividad proteolítica sobre azocaseína como sustrato (ver ensayo más adelante).

Efecto del calcio en el plegamiento de MP10

Para evaluar el efecto del calcio en el plegamiento *in vitro* de MP10 recombinante se realizó el ensayo de plegamiento, tal cual se describió en el punto anterior, pero incluyendo CaCl_2 a diferentes concentraciones (0, 100 y 200 μM) en el tampón de plegamiento. Luego de la centrifugación el sobrenadante se concentró diez veces

utilizando un centricon Amicon Ultra de 30,000 MWCO (Millipore) y se analizó el resultado por SDS-PAGE.

Purificación de MP10 recombinante por cromatografía de afinidad a metales

La proteína MP10 recombinante, fusionada a una etiqueta de histidinas en el extremo C-terminal, se purificó por cromatografía de afinidad a metales (IMAC, por su sigla en inglés, *Immobilized metal affinity chromatography*) utilizando la resina Ni-NTA agarosa (QIAGEN, Cat. 30210). 1 ml de resina se mezcló con 30 ml del sobrenadante del ensayo de plegamiento mediante un intercambio en “*batch*” a temperatura ambiente. La muestra se empaquetó luego en una columna de polipropileno de 1 ml de capacidad de lecho (QIAGEN, Cat.34924). Se lavó con cuatro volúmenes de tampón de lavado (Anexo III) y se eluyó utilizando el mismo tampón conteniendo 400 mM de imidazol, pH 7. Se colectaron fracciones de 0.5 ml y se agruparon aquellas en las que se verificó la presencia de la proteína de 50 kDa por SDS-PAGE. Para eliminar el imidazol y dejar la proteasa en el tampón de almacenamiento (Anexo III) se realizó una cromatografía de gel filtración con los eluatos agrupados, utilizando una columna PD-10 previamente equilibrada con dicho buffer.

Cuantificación de MP10 recombinante

La cuantificación de proteína se realizó por el método del ácido bicinconínico, utilizando el kit "*Pierce™ BCA protein assay kit*" (Thermo Scientific, Cat. 23227), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizó sero albúmina bovina (BSA de su sigla en inglés) como estándar.

Inmunodetección de MP10 por western blot

La fracción obtenida por cromatografía de afinidad se analizó por Western Blot utilizando el anticuerpo monoclonal Anti-His₆-Peroxidase (Roche, Cat. 11965085 001) el cual se utiliza para la detección de proteínas recombinantes con la etiqueta de histidinas. El mismo se encuentra conjugado a la enzima peroxidasa.

Luego de una separación electroforética las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF (SIGMA, Cat. Z671088) utilizando un dispositivo de transferencia semiseca y el tampón de transferencia Towbin (Anexo III) con el cual se remojó las placas de carbono del dispositivo así como la membrana y papeles Whatman®3MM. La transferencia se realizó durante 1 hora a 50 mA (0.8 mA/cm² de membrana). Finalizada la misma, la membrana se incubó durante 30 min en la solución de bloqueo (BSA al 2% en tampón PBS). La membrana se incubó durante 40 min en 10 ml de solución de bloqueo conteniendo 20µl de anticuerpo (dilución 1/500). Se lavó tres veces durante 1 minuto en tampón de lavado (Anexo III) y se incubó con 15 ml del reactivo de revelado SIGMAFAST™ 3,3'-Diaminobenzidine

(SIGMA Cat. D4418). Este reactivo contiene el sustrato diaminobenzidina que al ser oxidado por la peroxidasa genera un precipitado marrón en la membrana. Una vez desarrollada la coloración, se detuvo la reacción enjuagando la membrana con agua destilada.

VII. Caracterización parcial de la enzima recombinante

Determinación de actividad proteolítica

Las determinaciones de actividad enzimática se realizaron por el método de Andrews & Asenjo (1986) utilizando el sustrato para proteasas azocaseína (SIGMA, Cat. A2765). El mismo consiste en caseína conjugada al grupo cromogénico “azo”, que se libera de la caseína por hidrólisis, detectándose espectrofotométricamente a 340nm. Los ensayos se realizaron en tubo eppendorf, donde se incubó 250 µL de una solución de azocaseína 1% con 250 µL de tampón de actividad (Anexo III), durante 10 min a la temperatura de ensayo. Se adicionó luego 250 µL de la preparación enzimática y se incubó durante 20 min. La reacción se detuvo por el agregado de 500 µL de ácido tricloroacético (TCA) (25% w/v). Se centrifugó a 13790 *xg* por 30 min a temperatura ambiente para sedimentar los azo-péptidos no hidrolizados y se midió la absorbancia del sobrenadante a 340nm. Una unidad de enzima se definió como la cantidad de enzima necesaria para incrementar una unidad de absorbancia a 340nm, en las condiciones del ensayo.

Debido a que el método de determinación de actividad proteolítica de Andrews & Asenjo es un método a tiempo final, se determinó el momento en que debe detenerse la reacción (agregado de TCA) para asegurar el trabajo en condiciones de velocidad inicial. Para esto se trabajó con el sustrato azocaseína al 1% y a 37 °C midiendo la absorbancia a 340 nm cada 5 min, por un espacio de tiempo de 25 min. Se graficó la absorbancia a 340nm en función del tiempo para verificar la relación de linealidad.

La cantidad de enzima utilizada en cada determinación de actividad fue en el orden de los nanogramos.

Determinación de pH óptimo

El efecto del pH sobre la actividad enzimática se evaluó realizando los ensayos de actividad a 37 °C, diluyendo el sustrato azocaseína en diferentes soluciones tampón (todas a 50 mM) a diferente pH. Se utilizaron los siguientes sistemas buffer: acetato de sodio/ácido acético (pH 5.0), MES (pH 6), Tris-HCl (pH 7.0 y 8.0) y Glicina/NaOH (pH 9.0 y 10.0). Para cada condición se realizó un blanco sin enzima. Las mediciones se realizaron por triplicado y se graficó los valores de absorbancia en función del pH. Se realizaron dos réplicas del experimento.

Efecto de la temperatura sobre a actividad

El efecto de la temperatura sobre la actividad proteolítica de MP10 se analizó realizando el ensayo de actividad a 10, 20, 30, 37, 40, 48 y 55 °C en el tampón Tris-

HCl, pH8. Para cada condición se realizó un blanco sin enzima. Las mediciones se realizaron por triplicado y se graficó los valores de absorbancia en función de la temperatura de incubación. Se realizaron dos réplicas del ensayo.

Se determinó la actividad residual de MP10 tras la incubación de la misma a 45 °C a diferentes tiempos de exposición. Para esto la preparación enzimática se incubó a 45 °C durante 0, 5, 10, 15, 20, 25 min, posteriormente se enfrió en hielo y se utilizó para determinar la actividad residual a 37 °C.

Inhibición con EDTA

Para analizar el efecto del EDTA sobre la actividad de MP10, se realizó el ensayo de actividad pre-incubando el tampón de actividad conteniendo EDTA y la preparación enzimática durante 10 min a 37 °C. La reacción se inició con el agregado de la solución de azocaseína. Se ensayaron las siguientes concentraciones de EDTA: 5, 10 y 50 mM. Se determinó también la actividad proteolítica sin el agregado de EDTA, cuyo valor se fijó como 100%. Se incluyó un blanco sin enzima para cada condición y se realizaron las medidas por triplicado

VIII. Producción y purificación de la enzima nativa a partir del cultivo de *Pseudomonas sp. AU10*

Cultivo de *Pseudomonas sp. AU10* en medio PFm

Pseudomonas sp. AU10 se cultivó en medio PFm (Anexo III) a 13 °C durante 96 hs. Se monitoreó la densidad óptica a 600 nm para construir la curva de crecimiento (DO vs tiempo). Así mismo, en cada punto se analizaron las proteínas secretadas al medio de cultivo por SDS-PAGE y zimogramas a 4 °C.

Purificación de la proteasa nativa a partir del sobrenadante del cultivo

Cromatografía de intercambio iónico - 70ml de sobrenadante de cultivo de *Pseudomonas sp. AU10* en medio PFm, libre de células, se equilibraron a pH 8 y se inyectaron (utilizando una bomba peristáltica a una velocidad de flujo de 1.4 ml/min) en una columna cromatográfica XK 16/20 (Pharmacia) empaquetada con 15 ml del intercambiador aniónico “Q Sepharose Fast Flow” (Pharmacia) equilibrado en tampón Tris 20mM suplementado con CaCl₂ 1mM, pH8. Se lavó la columna con un volumen correspondiente a cinco volúmenes de gel. La elución se realizó aumentando la fuerza iónica del buffer, utilizando un gradiente de 0 a 0.2 M de NaCl. Se siguió la elución midiendo la absorbancia a 280nm. Los eluatos se analizaron por SDS-PAGE.

Cromatografía de afinidad - 1 ml de resina Ni-NTA (QIAGEN, Cat. 30210) se desmetaló lavándola con cinco volúmenes de una solución de EDTA 100mM, pH8. La resina se lavó con diez volúmenes de agua milliQ y se recargó con zinc, pasando cinco volúmenes de una solución de ZnSO₄ 100mM. Posteriormente, se equilibró en tampón Tris 20mM, conteniendo CaCl₂ 1mM, pH8. 10ml del percolado obtenido en la cromatografía de intercambio iónico se adsorbieron a la resina. La columna se lavó con cuatro volúmenes del mismo tampón y se eluyó la proteína utilizando tampón MES 50 mM, pH6.0. Inmediatamente se realizó un cambio de tampón utilizando una columna PD-10, que se equilibró en el tampón Tris 20mM, CaCl₂ 1mM, pH8. La proteína se almacenó congelada a -20 °C.

IX. Obtención del espectro de dicroísmo circular para la proteasa nativa y recombinante

Los espectros de dicroísmo circular en el UV lejano de la proteasa recombinante y la nativa se analizaron utilizando el espectrofotómetro de dicroísmo circular AVIV, modelo 215. Ambas proteínas se utilizaron a una concentración de 0.7 mg/ml diluidas en tampón Tris 20mM, CaCl₂ 1mM, pH8 y a temperatura de 25 °C.

Estos experimentos se realizaron en la plataforma de Biofísica de Macromoléculas y sus Interacciones del Instituto Pasteur de Paris

Resultados

I. Identificación de la proteasa extracelular MP10 producida por *Pseudomonas sp. AU10*

El análisis realizado por SDS-PAGE, del sobrenadante del cultivo obtenido luego de crecer la cepa de *Pseudomonas sp. AU10* en medio ML (LB diluido 20 veces suplementado con 5% de leche descremada) a 7°C, evidenció la presencia de una única banda proteica definida de aproximadamente 50 kDa (Figura 3A). El mismo sobrenadante se evaluó mediante un gel de actividad para analizar la capacidad de hidrolizar gelatina (zimograma; Figura 3B) a 4°C y 30°C, observándose la presencia de una única banda de transparencia que corresponde a la hidrólisis de la gelatina. Estos resultados sugieren la presencia de una proteína extracelular de aproximadamente 50 kDa con actividad proteolítica tanto a 4°C como 30°C. Se verificó además que el sobrenadante es capaz de hidrolizar proteínas lácteas (Figura 3C). Mediante el ensayo de Andrews & Asenjo realizado a 30 °C, se determinó que la actividad enzimática presente en el sobrenadante fue de 1.90 ± 0.05 UE/mL de preparado enzimático. Al cultivar AU10 en medio LB diluido 20 veces, sin el agregado de leche, no se registraron valores significativos de actividad (0.12 ± 0.05 UE), sugiriendo que en las condiciones ensayadas es necesaria la presencia de las proteínas lácteas para la producción de la enzima.

La banda proteica de 50 kDa, se recortó del gel de poliacrilamida y su perfil tríptico se analizó por espectrometría de masa MALDI-TOF. El análisis de los péptidos identificados permitió determinar que la proteína extracelular producida por el aislamiento AU10 (desde ahora la proteína, MP10) correspondería a una metaloproteasa alcalina extracelular de *Pseudomonas* (Figura 4A).

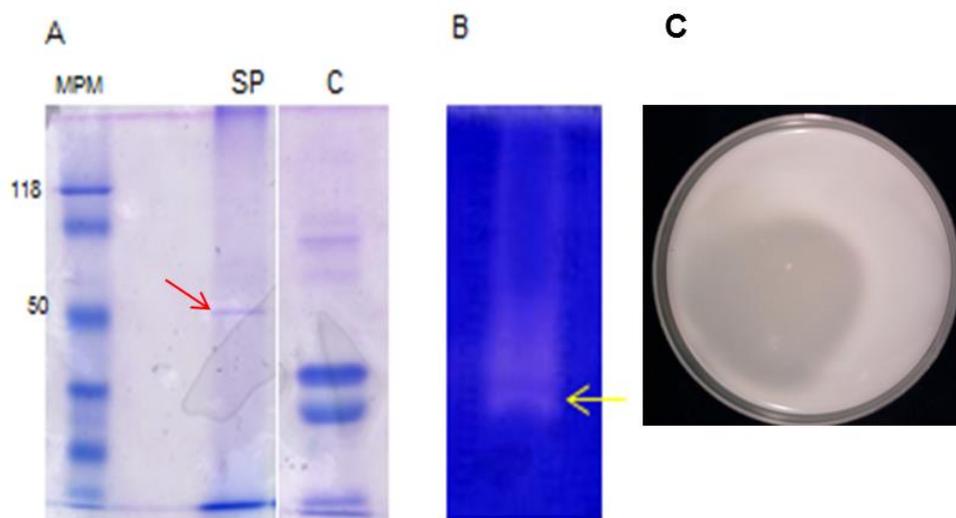


Figura 3. Análisis del sobrenadante del cultivo *Pseudomonas* sp. AU10 **A)** SDS-PAGE. SP: sobrenadante diluido al décimo, se indica con una flecha la banda proteica; C: perfil proteico de la leche descremada al 5%, antes de su hidrólisis por la proteasa producida por AU10; MPM: marcador de peso molecular, se indican las bandas proteicas correspondientes a 118 y 50 kDa. **B)** Zimograma. Se muestra solamente el gel incubado a 4 °C (a 30 °C el gel mostró el mismo perfil de actividad); se indica con una flecha la banda de transparencia que sugiere la hidrólisis de la gelatina. **C)** Placa de medio sólido ML, mostrando el halo de hidrólisis ocasionado por la actividad proteolítica del sobrenadante.

A

Protein Summary Report

Format As	Protein Summary (deprecated) ▼	Help
Significance threshold p<	<input type="text" value="0.05"/>	Max. number of hits <input type="text" value="20"/>
<input type="button" value="Re-Search All"/>	<input type="button" value="Search Unmatched"/>	

Index

Accession	Mass	Score	Description
1. gi 238623394	30681	227	alkaline metalloprotease [Pseudomonas fluorescens bv. A]
2. gi 30410775	49358	168	alkaline protease [Pseudomonas fluorescens]
3. gi 164665001	49346	168	AprX [Pseudomonas fluorescens]
4. gi 229590602	49434	168	metalloprotease [Pseudomonas fluorescens SBW25]
5. gi 8895497	49215	150	metalloprotease [Pseudomonas fluorescens]
6. gi 238623364	24340	150	alkaline metalloprotease [Pseudomonas sp. W2a]
7. gi 3135220	49272	149	metalloprotease [Pseudomonas fluorescens]
8. gi 4063015	49492	147	protease PrtA [Pseudomonas fluorescens]
9. gi 238623368	30305	145	alkaline metalloprotease [Pseudomonas sp. W30a]
10. gi 238623396	30301	145	alkaline metalloprotease [Pseudomonas fluorescens]
11. gi 3646411	49378	141	metalloprotease [Pseudomonas tolaasii]
12. gi 312960983	49209	137	serralysin [Pseudomonas fluorescens WH6]
13. gi 164665003	50214	136	AprX [Pseudomonas fluorescens]
14. gi 238623370	28402	135	alkaline metalloprotease [Pseudomonas sp. W15a]
15. gi 238623402	29511	135	alkaline metalloprotease [Pseudomonas fluorescens bv. C]
16. gi 238623374	29759	135	alkaline metalloprotease [Pseudomonas sp. W12b]
17. gi 238623398	29461	134	alkaline metalloprotease [Pseudomonas rhodesiae]
18. gi 238623404	30036	134	alkaline metalloprotease [Pseudomonas fluorescens bv. C]
19. gi 238623423	30117	134	alkaline metalloprotease [Pseudomonas azotoformans]
20. gi 238623372	30277	134	alkaline metalloprotease [Pseudomonas sp. Z57b]

B

Matched peptides shown in **bold red**.

```

1  SHLYDRGGNL TVNGKPSYSV DQAATQLLRD GAAYRDFDGN GKIDLTYTFL
51 TSASSATMNK HGISGFSQFN TQQAQAALA MQSWSDVANV TFTEKASGGD
101 AHMTFGNYSY GQDGAAAFAY LPGTGAGYDG TSWYLTNNSY TPNKTPDLNN
151 YGRQILTHEI GHILGLAHPG DYNAGNGNPT YNDATYGQDI RGYSVMSYWS
201 ESNTNQNFSK GGVEAYASGP LIDDIAAIQK LYGANYSTRA GDTTYGFNSN
251 TGRDFYSAKS NADKLVFSVW DGGGNDILDF SGFTQNQ

```

Figura 4. **A)** Resumen del listado obtenido mediante el análisis por EM MALDI-TOF con el motor de búsqueda MASCOT. Se muestran los primeros 20 hits del análisis. **B)** Primera proteína de la puntuación obtenida del análisis. Los péptidos identificados se señalan en rojo.

II. Identificación del gen *mp10* y regiones flanqueantes

Obtención de una región parcial del gen

En la Figura 5 se muestra el resultado de la amplificación con cebadores degenerados, diseñados a partir de dos péptidos identificados por EM (péptidos rojos subrayados en la Figura 4B). Se obtuvo un amplicón de aproximadamente 500pb, el cual se clonó y se secuenció en el servicio correspondiente de Macrogen, Corea. El análisis de la secuencia obtenida con el programa de alineamiento de secuencias BLAST “*Basic Local Alignment Search Tool*” del servidor NCBI mostró un elevado porcentaje de similitud con secuencias de metalo-proteasas dependientes de zinc de *Pseudomonas* (Figura 6), coincidiendo con los resultados obtenidos por EM (Figura 4A).

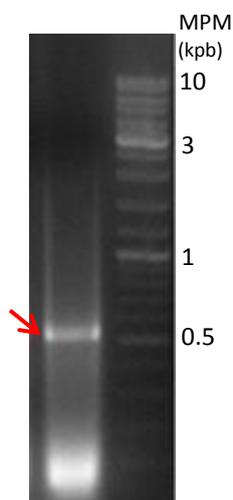


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Se muestra el fragmento amplificado de 500pb del gen codificante de la metalo-proteasa. MPM es el marcador de peso molecular; se indica el tamaño de algunas bandas en Kb

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident
Pseudomonas fluorescens metalloprotease (aprX) gene, complete cds	763	763	100%	0.0	94%
Pseudomonas fluorescens bv. A partial aprX gene for alkaline metalloprotease, type strain LMG 1794T	747	747	100%	0.0	93%
Pseudomonas tolaasii partial aprX gene for alkaline metalloprotease, type strain LMG 2342T	741	741	100%	0.0	93%
Pseudomonas tolaasii eprA, eprI, eprD, eprE and eprF genes	741	741	100%	0.0	93%
Pseudomonas fluorescens gene for metalloprotease, complete cds	708	708	100%	0.0	92%
Pseudomonas fluorescens strain TSS extracellular metalloprotease (aprX) gene, complete cds	702	702	100%	0.0	91%
Pseudomonas fluorescens bv. A partial aprX gene for alkaline metalloprotease, strain LMG 5830	702	702	100%	0.0	91%
Pseudomonas sp. 3-37 T4 family peptidase gene, partial cds; and extracellular alkaline metalloprotease AprA (apr)	697	697	100%	0.0	91%
Pseudomonas fluorescens A506, complete genome	697	697	100%	0.0	91%

Figura 6. Ventana de salida de la herramienta BLAST del servidor NCBI. Se muestra el resultado de la comparación de la secuencia parcial del gen contra secuencias informadas a la base de datos.

Utilizando los cebadores específicos Fwd_AU10E23 y Rev_AU10E422, diseñados en base a la secuencia nucleotídica del amplicón obtenido usando cebadores degenerados, se confirmó la secuencia parcial del gen codificante de la proteasa.

Secuencia codificante del gen y su contexto genético

La secuencia codificante (CDS) se obtuvo utilizando la estrategia de PCR inversa (ver Materiales y Métodos). En la Figura 7 se muestra el resultado de la reacción de PCRi, usando como templado diferentes autoligaciones. Los fragmentos de ADN de 4000 y 3500 pb, amplificados a partir de las autoligaciones de ADNg digerido con *Bam*HI y *Nco*I, se purificaron desde el gel de electroforesis y se clonaron en el vector pTZ57R/T (InsTAclone, Fermentas), obteniéndose los plásmidos pM_BAM y

pM_NCO. Los fragmentos clonados se secuenciaron a partir de las regiones del plásmido que hibridan con los cebadores universales M13F y M13pucR.

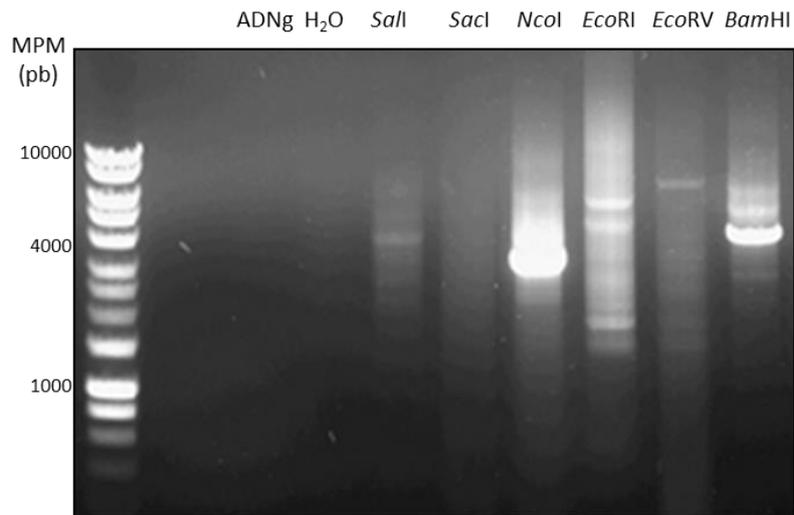


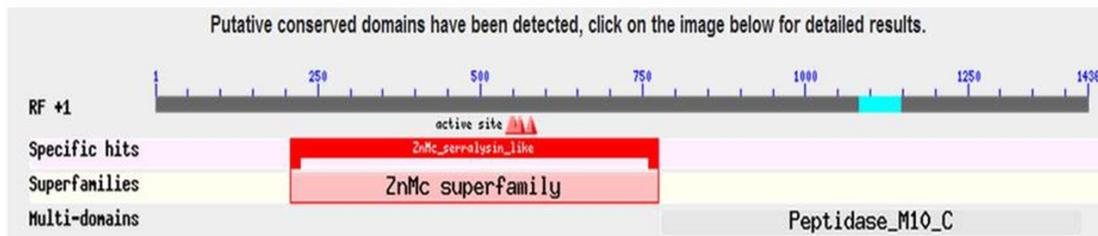
Figura 7. Resultado de la PCRi. Se muestran los productos de amplificación obtenidos utilizando diferentes autoligaciones como templado. Los carriles denominados ADNg y H₂O corresponden a los controles negativos de reacción, utilizando ADNg de *Pseudomonas* sp. AU10 sin digerir como templado y agua, respectivamente.

Con las secuencias obtenidas, editadas y empalmadas, se reconstruyó un fragmento genómico de 3689 pb. Este fragmento contenía la totalidad de la región codificante para la metalo-proteasa, y también información de las regiones flanqueantes al gen (Anexo IV)

Se determinó que la secuencia nucleotídica codificante de MP10 tiene 1434 pb y el análisis de la misma con la herramienta informática BLAST del servidor NCBI

permitió identificar a la proteasa como un miembro de la super familia de metalo-proteasas dependientes de zinc (Figura 8A). El mismo resultado se obtuvo al comparar la secuencia con aquellas depositadas en la base de datos de peptidasas denominada MEROPS. Por comparación con secuencias homologas depositadas en dicha base de datos, se determinó que MP10 es un miembro de la familia de proteasas M10, subfamilia M10B, en la cual la serralisina de *Serratia marcescens* es la proteasa modelo. Todas las metalo-proteasas pertenecientes a la familia M10 forman parte de un clan denominado Metzincinas. Las proteasas de este clan presentan una metionina conservada, que se ubica en la posición C-terminal respecto al ligando zinc, formando lo que se conoce como un “Met-turn”. En la misma hebra de ADN en la que se encuentra la CDS de MP10 se encontró un marco abierto de lectura que codificaría una proteína de 138 aminoácidos, similar a un inhibidor de proteasa, y parte de un marco abierto de lectura que codificaría para parte de una proteína que compone un transportador del tipo ABC (perteneciente a los sistemas de secreción de tipo I, SSTI). En la Figura 8B se muestra un esquema de este arreglo tipo operón.

A



B

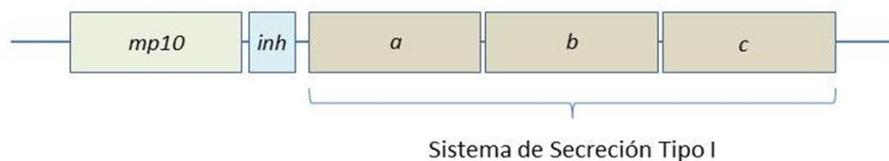


Figura 8. Proteína MP10 y su contexto genómico. **A)** Dominios conservados de MP10 según la comparación de secuencias en la base de datos de la NCBI. **B)** Esquema general de la organización del gen *mp10*, el posible inhibidor y el SSTI.

III. Características de la metalo-proteasa MP10 (análisis in silico)

Identificación de aminoácidos catalíticos

MP10 tiene 477 aminoácidos, una masa molecular y punto isoeléctrico teóricos de 49.368 Da y 4,79, respectivamente, determinados utilizando el servidor ExPASy. En su secuencia se pudo verificar la presencia del motivo HEXXHXXGXXH, característico de las zinc metalo-proteasas. Este motivo presenta los aminoácidos del sitio catalítico de MP10 (identificado por comparación de la secuencia con metalo-proteasas homólogas): histidina en la posición 183, el glutamato 184, la histidina 187 y la histidina 193. También la tirosina 223 es uno de los residuos del sitio activo (Figura 9A).

Señales de secreción

El análisis de la secuencia de MP10 con el servidor SignalP 4.1 indicó que la proteasa no posee péptido señal de secreción en el extremo N-terminal. Al igual que otras proteasas de la familia, MP10 tiene las señales de secreción en el extremo C-terminal. Estas consisten en cuatro repeticiones del motivo Gly-Gly-Xaa-Gly-Xaa-Asp, las mismas se indican en la secuencia presentada en la Figura 9A.

A

```

TCCTTAAG TGAAT CTGTG TCACATTT TCGCTG GGAAATATG GTG TAGACGAAAG ATTTCAAG TTGTGTCAGTTTCGAT ACGCC
TTCAAAGAGGTGAGTGATGGGACGATCTCGTCCGCGAGGTTCTATCGACCAAAGACTGATGCACTTGCAAAC AAGGAAGT
ACGTTT ATG SD
MSKVKDKAIVSAAQASTAYSQIDSFHQYDRGGNLTVNGKPSFTVDQAADHLLRDGAAYKDVNHNGKIDLTYTFLASAS
SATMKNKHGISGFSQFNTQQKAQAVLAMQSWADVANSFTESASGGDTHMTFGNYSGGQAGAAAFAYLPGTGAGYDG
TSWYLTNSSYTPNKAPDLNNGRQTLT HEIGHTLGLAHPGDYNAGTGNPTYKNADYGDTRGYSVMSYWSESNTNQ
NFTKGGVEAYASGPLIDDIAAIQKLYGANYNTRAGDTTYGFNSNTGRDFYSATSADKLVFSVWDGGGNDTLDFSGFT
QNQKINLNEASFSDVGGVLVGNVSIAGVTVENAF GGSGNDLIIGNNAANLIKGGAGNDIY GGGGADQLWGGAGNDTFV
FGASSDSKPGAADKIFDFTSGSDKIDLSGITKGAGLTFVNAFTGHAGDAVLSYASGTLGLAVDFSGHGVADFLVTTVG
QAVASDIVA
  
```

B

```

MEQKMPRFSHLIACASQVLFVSAGAHAMASSLVLPPTAQLAGHWQLHQDQVLCALDLLDQPNALAGDVVCAEQWLGD
KPLTWLPTPDGIWLMNAQGTGIIHLNREKDG EYKGH TASI PGSCAATNTLIKSYKHITRF
  
```

Figura 9. Secuencia primaria de MP10 y el posible inhibidor. **A)** Se muestra, corriente arriba del codón de inicio (ATG), posibles elementos -35 y -10 (recuadrados), sitios de unión para factores de transcripción (*crp*, TCACATTT; and *putR*, ATTTCAAG, en celeste), y secuencia Shine-Dalgarno (SD, subrayado). En la secuencia aminoacídica, desde Nt a Ct, se muestra en rojo el pro-péptido, los aminoácidos implicados en la catálisis y cuatro repeticiones del motivo GGAGND implicado en la unión a calcio y secreción de la enzima. **B)** Secuencia aminoacídica del inhibidor. En celeste se indica un probable péptido de señal de secreción.

pseud), AAD09851 (PrtA Pseud) y ZP_07775488 (pro2 Pseud) y la proteasa de *S. marcescens* MER001096. La línea roja indica el sitio de corte del pro-péptido.

Abundancia de aminoácidos implicados en la flexibilidad estructural

Se comparó la secuencia primaria de MP10 y de una proteasa mesófila homóloga, la metalo-proteasa extracelular alcalina producida por *P. aeruginosa* PAO1 (GeneBank: AAG04638.1). Se determinó que MP10 presenta una disminución en el número de aminoácidos que tienden a rigidizar la estructura proteica (Pro, Arg, Asp, Glu). Asimismo, se constató un aumento en el número de glicinas, residuo que contribuye a la flexibilidad estructural. La Tabla 5 resume los resultados obtenidos.

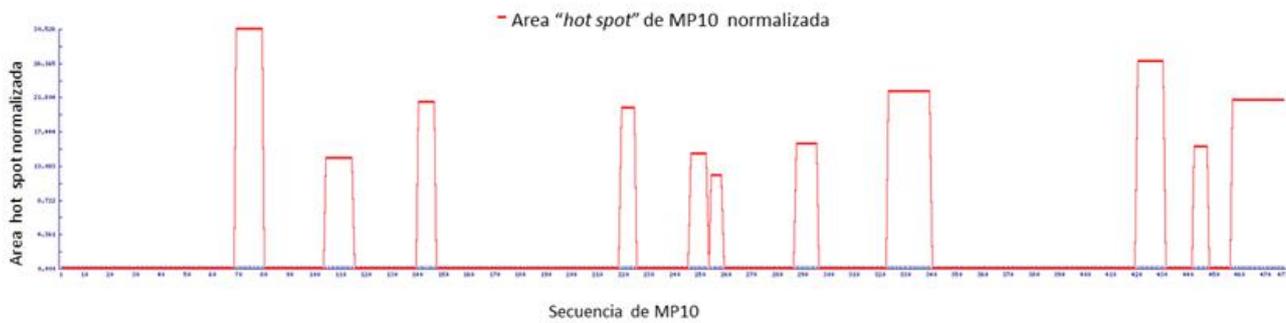
Tabla 5. Frecuencia de aminoácidos relevantes para la flexibilidad estructural en MP10 (477 aa) y la metaloproteasa AP de *P. aeruginosa* PAO1 (479 aa)

Aminoácido	MP10	AP(PAO1)
Pro	8	11
Arg	6	8
Asp	37	43
Glu	6	12
Gly	67	55

Búsqueda de regiones aminoacídicas con tendencia a la agregación proteica

La secuencia aminoacídica de MP10 se analizó con el software AGGRESKAN para definir regiones con tendencia a la agregación. Los cálculos empleados por el software se basan en valores de propensión a la agregación para cada aminoácido que derivan de resultados experimentales y asume que secuencias cortas y específicas de aminoácidos modulan la agregación proteica (Conchillo-Solé et al. 2007). Se encontró que existirían once regiones en la secuencia de la proteasa que presentarían una tendencia a la formación de agregados. En la Figura 11A se muestra el gráfico de área de MP10, mostrando las regiones “*hot spot*” propensas a formar agregados. Los aminoácidos pertenecientes a estas regiones se muestran resaltados en la Figura 11. Considerando que la próxima etapa del trabajo implica la producción recombinante de la proteína, estos resultados permitirían anticipar posibles fenómenos de agregación.

A



B

MSKVKDKAIVSAAQASTAYSQIDSFHQYDRGGNLTVNGKPSFTVDQAADHLLRDGAAYK
 DVNHNGKI **DLTYTFLASAS**SATMKNKHGISGFSQFNTQQKAQAV**LAMQSWADVAN**VSFTES
 ASGGDTHMTFGNYSGGQAG**AAAFAYL**PGTGAGYDGTSWYLTNSSYTPNKAPDLNNYGRQT
 LTHEIGHTLGLAHPGDYNAGTGNPTYKNADYGQDTRGY **SVMSYW**SESNTNQNFYKGGVEA
 YASGP**LIDDIAAI****QKLYG**ANYNTRAGDTTYGFNSNTGRDFYSATSN**ADKLVFSVW**DGGGN
 DTLDFSGFTQNQKINLNEASFS**DVGGLVGNVS****IAGVTV**ENAFGGSGNDLIIGNNAANLI
 KGGAGNDIIYGGGGADQLWGGAGNDTFVFGASSDSKPGAADKIFDFTSGSDKIDLSGIT**K**
GAGLTFVNAFTGHAGDAVLSY**ASGTNI**GTLAVDFSGHGM**ADFLVTTVGQAVASDIVA**

Figura 11. Regiones propensas a la agregación. **A)** Gráfico de área mostrando la ocurrencia de puntos “hot spot” de agregación. Se grafica el perfil de agregación por encima del valor umbral en un determinado “hot spot” vs. la secuencia aminoacídica. **B)** Secuencia de MP10 con los aminoácidos que forman parte de los “hot spot” resaltados en naranja.

IV. Producción recombinante de la proteasa MP10 en E. coli

Construcción del vector de expresión pMP10-H6

En la Figura 12 se muestra un esquema del vector de expresión pMP10-H6, construido (según se detalla en Materiales y Métodos) para expresar la proteasa MP10. El vector resultante tiene 6798 pb, y en el mismo la expresión de MP10 queda bajo el control del promotor T7 (inducible con IPTG). Así mismo, la secuencia aminoacídica de la proteasa recombinante queda fusionada a una etiqueta de histidinas (6xHis *tag*) en el extremo C-terminal para facilitar su posterior purificación por cromatografía de afinidad a metales inmovilizados.

Para verificar que la secuencia de MP10 se encontraba en fase y no presentaba mutaciones, varios clones (vector pMP10-H6 de varios clones) se secuenciaron a partir de las regiones que hibridan con los cebadores T7, y se verificó que al menos uno de ellos presentaba la secuencia del gen de MP10 en fase y que no presentaba mutaciones. Se continuó trabajando con esta construcción.

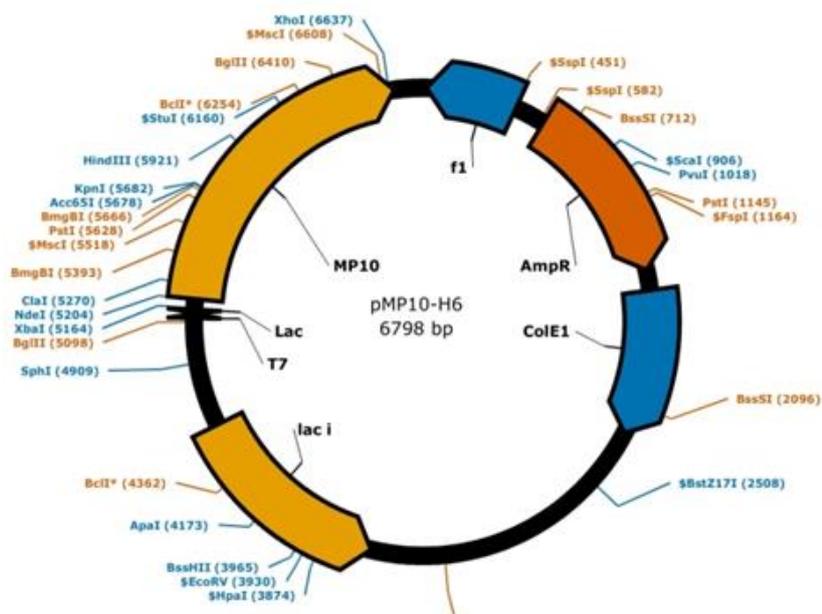


Figura 12. Mapa del vector de expresión pMP10-H6. Se indica la ubicación del gen *mp10*, promotor T7 (T7), el casete de resistencia a Amp (AmpR), gen *lacI*, origen de replicación.

Evaluación de distintas cepas de *E. coli* para la producción de MP10

Inicialmente, la producción recombinante de la proteasa MP10 se analizó en tres cepas de expresión, *E. coli* BL21, *E. coli* C41 y *E. coli* C43, a 30 °C y en medio LB. Las cepas C41 y C43 se utilizan comúnmente para la expresión de genes potencialmente tóxicos. Ambas cepas presentan diferentes mutaciones a nivel del promotor *lacUV5* que controla la expresión de la T7 RNA polimerasa. Estas mutaciones debilitan dicho promotor, disminuyendo la cantidad de ARN mensajero de T7 RNA polimerasa que se sintetiza y reduciendo por tanto los niveles de expresión de la misma. Esta característica hace a estas cepas más adecuadas para la expresión de genes potencialmente tóxicos para la célula. En la Figura 13 se

muestra el resultado de la electroforesis en la cual se analizó el ensayo de expresión. La inspección visual del gel sugiere que la proteína MP10 no se encontraría presente en la fracción soluble de ningún tratamiento (o cepa de expresión), o que se encontraría presente en muy baja cantidad. No se detectó actividad proteolítica en dichas fracciones según el ensayo de Andrews & Asenjo, lo cual reforzaría la presunción de que MP10 no se encontraría en la fracción soluble. En los carriles correspondientes a las fracciones insolubles de las cepas transformadas con pMP10-H6 se observa una banda proteica de aproximadamente 50 kDa, la cual no se observa en las fracciones insolubles de los controles (cepas transformadas con el vector vacío). La presencia de MP10 en las fracciones insolubles indica que la misma se acumularía como agregados en cuerpos de inclusión. El mayor nivel de expresión de MP10 se obtuvo con la cepa *E. coli* C41.

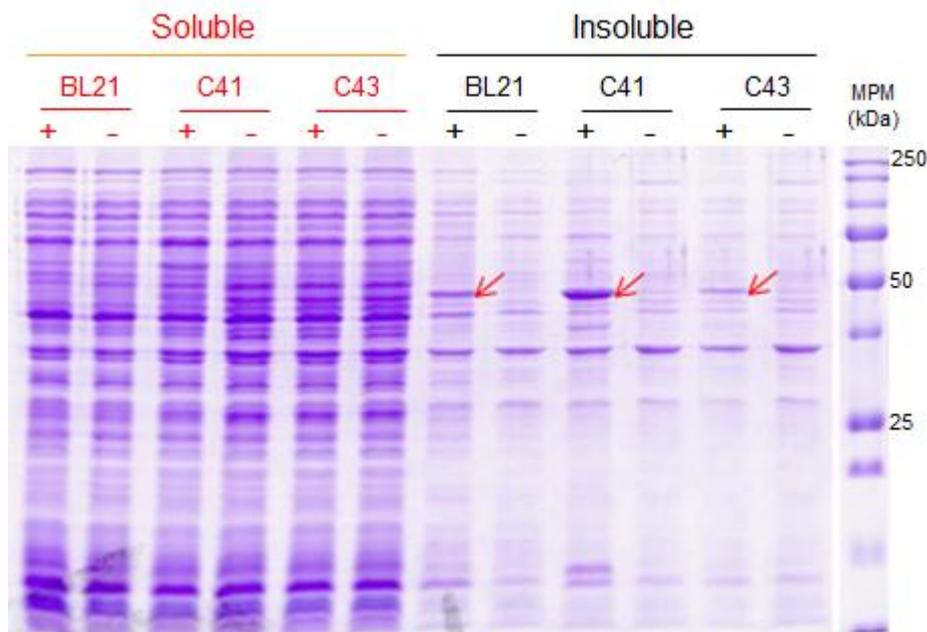


Figura 13. Evaluación de la producción de MP10 en las cepas BL21, C41 y C43. Los carriles señalados (+) indican la cepa transformada con el vector pMP10-H6. Los carriles (-) corresponden a la cepa transformada con el vector vacío (sin el inserto correspondiente al gen *mp10*). La flecha roja indica la banda proteica correspondiente a MP10. A diferencia de las cepas C41 y C43, la cepa BL21 no fue inducida por el agregado de IPTG. MPM es el marcador de peso molecular *Precision Plus Protein™ All Blue Standards* (BIO-RAD).

Se destaca que el cultivo de BL21 transformado con el vector pMP10-H6 creció de forma más lenta que la cepa control transformada con el vector sin inserto (Figura 14). El control de las fracciones solubles e insolubles de estos cultivos (sin inducir por el agregado de IPTG) por SDS-PAGE muestran la producción de MP10 aún en ausencia del inductor. Esto indicaría que el nivel basal de expresión de la proteasa recombinante detectado en BL21 tiene un efecto deletéreo sobre el crecimiento del

cultivo y reafirma la importancia de utilizar una cepa de expresión que tenga mayor tolerancia para la expresión de genes tóxicos como proteasas.

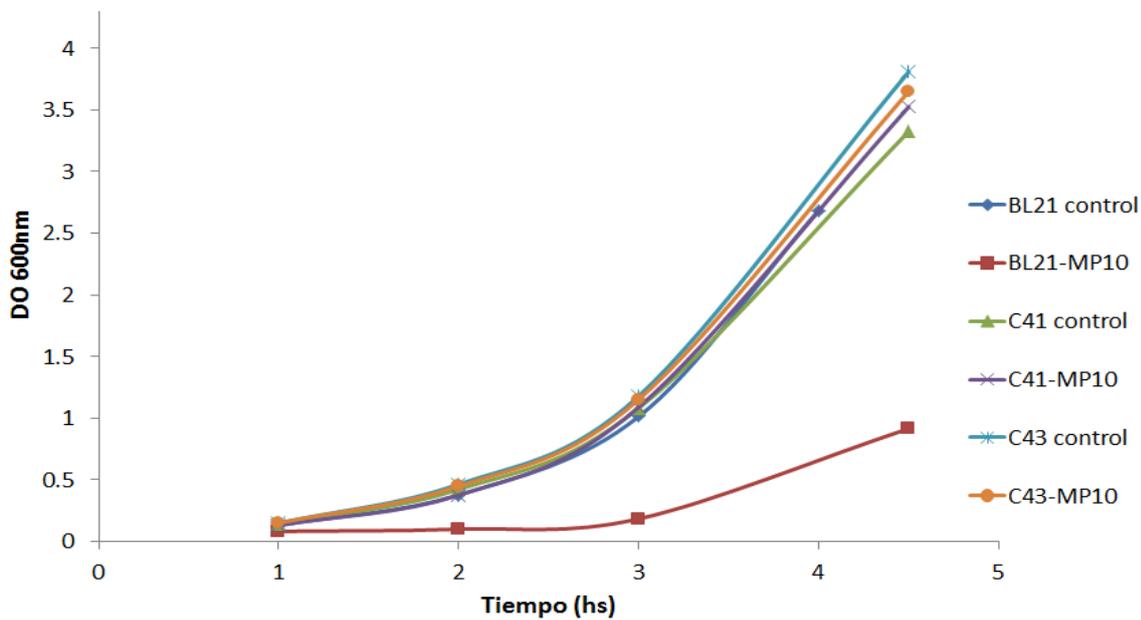


Figura 14. Crecimiento de las cepas de expresión transformadas con el vector de expresión pMP10-H6 (cepa-MP10) y con el vector pET22b(+) sin inserto (cepa-control), a 30 °C.

Dado que el mayor nivel de expresión se observó para la cepa C41, la misma se seleccionó para continuar el trabajo. Asimismo, considerando que se observó un fenotipo de toxicidad, se decidió reforzar la represión del sistema transformando la cepa C41 con el plásmido pDIA17. El plásmido pDIA17 lleva una copia del gen *lacI* (bajo el control del promotor de tetraciclina), que codifica el represor LacI. Esto

contribuye a reforzar la represión de la expresión de la T7RNAP en ausencia del inductor y evitar cualquier nivel basal de expresión de la proteasa MP10 que pudiera afectar el crecimiento del cultivo. pDIA17 lleva además un gen que confiere resistencia a cloranfenicol y el origen de replicación del plásmido p15A, diferente al del vector de expresión, lo que permite que la bacteria mantenga ambos plásmidos. La cepa de expresión *E. coli* C41/pDIA17 se transformó con el vector de expresión pMP10-H6 utilizando el protocolo de choque térmico de baja eficiencia. Los resultados presentados a continuación se obtuvieron siempre trabajando con *E. coli* C41/pDIA17.

Inducción de la expresión de MP10 a 12 °C

Considerando que la solubilidad de algunas proteínas recombinantes con tendencia a formar agregados insolubles se mejora realizando la expresión a temperaturas sub óptimas para el crecimiento de *E. coli*, se evaluó la producción de MP10 realizando la inducción a 12 °C.

Luego de 18 h de inducir la expresión de MP10 por el agregado de IPTG, se verificó que la DO a 600nm del cultivo transformado con el vector de expresión disminuía de 0.6 (al momento de la inducción) a 0.5. Esto sugiere que las células se habrían lisado, o por lo menos no habrían continuado creciendo tras el agregado del inductor IPTG. El control de C41/pDIA17 con el vector de expresión vacío (sin inserto),

sometido al mismo procedimiento, no presentó una disminución de la DO a 600nm, siendo el valor final de la misma, al momento de la cosecha de células, de 2.68. Además, por SDS-PAGE se evidenció que el sobrenadante del cultivo inducido presenta un perfil proteico similar al detectado en la fracción soluble (Figura 15). Esto sugiere que las células se habrían lisado, liberando su contenido. El análisis del sobrenadante del cultivo control (donde no se detectó disminución de la DO con el tiempo) no muestra bandas proteicas (libre de proteínas) (Figura 15).

En ninguna de las fracciones del cultivo inducido se pudo observar una banda de 50 kDa que estuviera sobre-representada y fuera indicativa de la expresión de MP10 soluble o de su acumulación en cuerpos de inclusión. Sin embargo, el análisis de las mismas fracciones por zimograma incubado a 4 °C indicó la presencia de actividad proteolítica sobre gelatina, lo cual indica que MP10 se estaría expresando en estas condiciones. El resultado sugiere que una parte de la enzima se encontraría soluble y activa. Como era de esperar, no se registró actividad en las fracciones del cultivo control. El fenómeno de lisis celular observado tras la expresión de MP10 a baja temperatura indicaría que la producción citoplasmática de la enzima recombinante en la fracción soluble en *E. coli*, sería deletérea para el crecimiento de las células.

Estos resultados sugieren que para obtener suficiente cantidad de proteína recombinante para purificar y caracterizar, sería razonable recuperarla desde los cuerpos de inclusión.

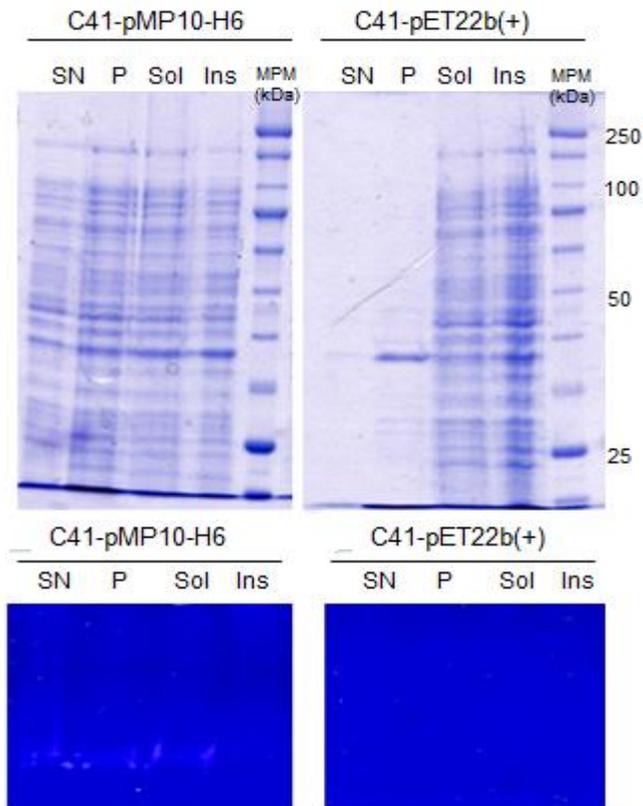


Figura 15. Ensayo de expresión a 12 °C. Se muestran los SDS-PAGE (arriba) y zimograma a 4 °C (abajo), donde se analizó el sobrenadante de cultivo (SN), fracción periplasmática (P), fracción soluble (Sol) e insoluble (Ins) tras la inducción por 18h para la cepa transformada con el vector de expresión (C41-pMP10-H6) y control con vector vacío (C41-pET22b(+)). Se utilizó el marcador *Protein Ladder* 10 – 250 kDa (New England BioLabs).

V. Producción y purificación de MP10 a partir de los cuerpos de inclusión

Considerando que, en las condiciones ensayadas, la expresión de MP10 resultó en la agregación de la proteína o en la ocurrencia de un fenómeno de toxicidad como consecuencia de la mejora en la solubilidad de la enzima recombinante, se procedió a recuperar la proteasa desde los cuerpos de inclusión realizando el plegamiento in vitro de MP10 mediante el método de dilución rápida. El método de permite diluir tanto el agente caotrópico (en este caso la urea) como la proteína de interés en un mismo paso. Esto favorece la formación de interacciones intramoleculares, necesarias para que la proteína adopte su conformación nativa, a la vez que disminuye la ocurrencia de las interacciones intermoleculares, que generan agregados proteicos.

En la Figura 16 se muestra el resultado del ensayo de expresión de MP10 en C41/pDIA17 en medio LB a 37 °C y purificación de cuerpos de inclusión. En estas condiciones, se observó un importante nivel de expresión y acumulación de MP10 en agregados insolubles. El resultado del análisis de las fracciones soluble e insoluble en el gel de actividad incubado a 4 °C indican que: i) la fracción correspondiente a los cuerpos de inclusión (en urea 8M) presenta actividad proteolítica sobre gelatina, y representaría la fracción donde se acumula

mayoritariamente la enzima. ii) existe acumulación de MP10 activa en la fracción soluble, aunque en la SDS-PAGE no se detectara una banda proteica de intensidad apreciable.

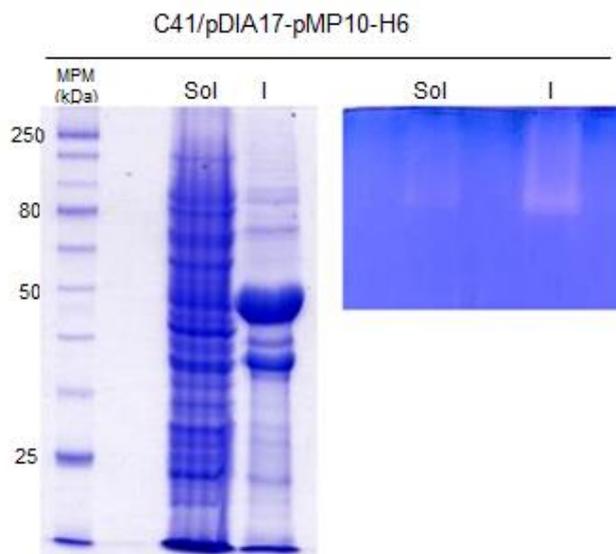


Figura 16. Producción de MP10 en LB a 37 °C y purificación de cuerpos de inclusión. Se muestra el análisis por SDS-PAGE (izquierda) y zimograma a 4 °C (derecha) de la fracción soluble (sol) y los cuerpos de inclusión solubilizados en urea 8M (I). Se utilizó el marcador *Protein Ladder* 10 – 250 kDa (New England BioLabs).

Curiosamente, la misma fracción insoluble (en urea 8 M) que presentó actividad en los geles de actividad, no presentó actividad proteolítica sobre azocaseína (ensayo de Andrews & Asenjo). Estos resultados (detección de actividad por zimograma y no por Andrews & Asenjo) podrían atribuirse a un posible efecto de plegamiento *in vitro* de MP10 que ocurriría durante la corrida electroforética en el gel de actividad. En

este sentido, MP10 se estaría separando del agente caotrópico (urea) durante la migración, experimentando un fenómeno de plegamiento *in vitro*, que le permitiría adoptar su conformación nativa y activa. Esta observación sugiere que la estrategia de recuperación de la proteína recombinante desde los cuerpos de inclusión y su posterior plegamiento podría resultar viable.

VI. Plegamiento in vitro de MP10 por el método de dilución rápida

La proteasa MP10 se logró plegar exitosamente diluyendo 37.5 veces la preparación de cuerpos de inclusión en el tampón de replegado (Tris 50mM, NaCl 150 mM, pH7), según se describe en Materiales y Métodos. Al analizar el sobrenadante del ensayo (conteniendo proteínas solubles) por SDS-PAGE, se observó la presencia de una banda de 50 kDa (Figura 17, carril 0) así como otras bandas de mayor y menor peso molecular. Luego de cada ensayo de plegamiento se analizó la actividad proteolítica sobre azo-caseína mediante el ensayo de actividad de Andrews & Asenjo.

Efecto del calcio en el plegamiento *in vitro* de MP10 - Considerando que el calcio cumple un rol importante en la estabilización y plegamiento *in vivo* de proteasas homologas a MP10, se evaluó su efecto sobre el plegamiento de la proteasa recombinante. En la Figura 17 se observa que al incluir 100 μ M de CaCl_2 en el

tampón de plegamiento se obtiene un rendimiento mayor de la proteína de 50 kDa, correspondiente a MP10 soluble y re-plegada tal cual se observa al comparar las intensidades de banda en el gel de la figura 17. El agregado de mayores concentraciones de CaCl_2 no parece incrementar significativamente el rendimiento en la recuperación de MP10 en forma soluble, tal como se observa en la Figura 17.

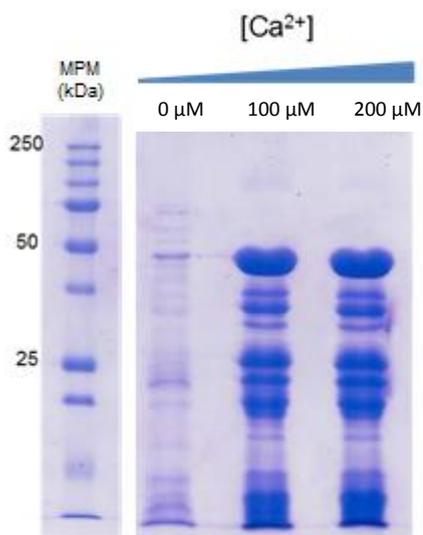


Figura 17. Efecto del Ca^{2+} en el plegamiento *in vitro* de MP10. Se analizó por SDS-PAGE el sobrenadante (concentrado 10 veces) del ensayo de replegamiento realizado en presencia de 0, 100 o 200 μM de CaCl_2 . Se utilizó el marcador de peso molecular *Precision Plus Protein™ All Blue Standards* (BIO-RAD)

VII. Purificación de MP10 recombinante

La proteasa MP10, solubilizada y plegada, se purificó por IMAC según se describe en Materiales y Métodos. Para la purificación de MP10 se utilizó el total del

sobrenadante del ensayo de plegamiento *in vitro*. En la Figura 18 se muestra el progreso de la purificación. Se observó que parte de la proteína eluyó en los lavados, sugiriendo que se superó la capacidad de adsorción de la columna. No obstante, la mayoría de la proteína se recuperó en los eluatos. Se observó también que en las fracciones eluidas existe un gran número de bandas proteicas de menor masa molecular, comparado con la masa molecular de MP10. La ausencia de bandas mayores a 50 kDa podría sugerir que se trata de productos de degradación de MP10.



Figura 18. Control por SDS-PAGE de las etapas de purificación e inmunodetección de MP10 recombinante. **A)** Purificación de MP10 por IMAC. Se sembró una alícuota del sobrenadante del ensayo de plegamiento realizado en presencia de 100 μM de CaCl_2 (T), el percolado (P), lavados y fracciones eluidas de 0.5 ml. **B)** Western Blot utilizando el anticuerpo anti His_{6x} para detectar la proteasa en la fracción eluida (E). Se utilizó el marcador de peso molecular *Precision Plus Protein™ All Blue Standards* (BIO-RAD)

Al analizar la proteína eluida de la cromatografía de IMAC mediante Western Blot, utilizando un anticuerpo ANTI-His, se detectó la banda de 50 kDa, así como los productos de menor peso molecular. Esto indicaría que las bandas de menor masa molecular, que co-purificaron con MP10, son productos de degradación de la propia proteasa. La proteasa se estaría degradando desde el extremo N-terminal, en solución y/o durante la inmovilización a la matriz cromatográfica. Queda pendiente la dilucidación de si esta degradación es producto de autoproteólisis o debida a la acción de otras proteasas.

Finalmente, la proteasa MP10 (eluato de la IMAC) se sometió a un paso adicional de purificación. Se realizó una gel filtración, utilizando una columna PD-10 (GE), para eliminar los péptidos menores a 5 kDa, así como para cambiar el tampón en el que se encontraba la proteína, y por consiguiente eliminar el imidazol presente en el tampón de elución. La proteasa MP10, ahora en tampón Tris 20 mM, CaCl₂ 1 mM, pH8, se almacenó a -20 °C.

VIII. Caracterización parcial de MP10

Validación del ensayo de actividad proteolítica

El método de determinación de actividad desarrollado por Andrews & Asenjo, que utiliza azocaseína como sustrato, es un método a tiempo final. Así que en primera

instancia se determinó la relación de linealidad entre la la hidrólisis del grupo “azo” y el tiempo de transcurso de la reacción. En la Figura 19 se puede observar la relación lineal entre la absorbancia a 340 nm y el tiempo de reacción. El resultado valida las condiciones establecidas para la realización del ensayo de actividad (20 min) y confirma que durante todo el estudio se estuvo trabajando en condiciones de velocidad inicial.

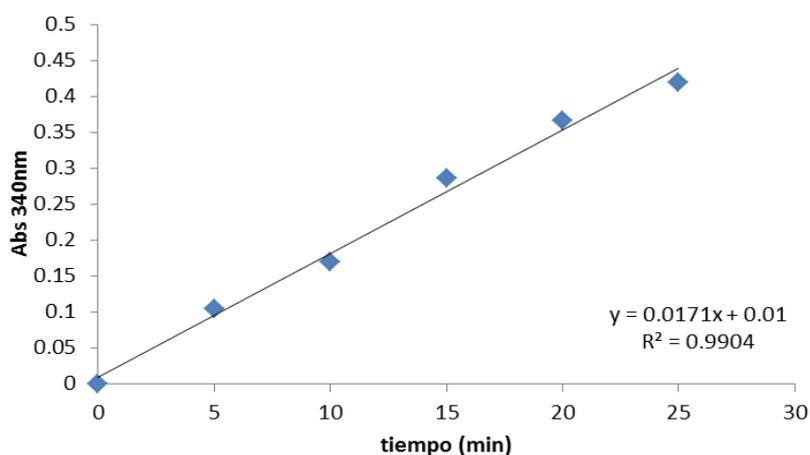


Figura 19. Verificación de las condiciones de velocidad inicial en el ensayo de actividad.

pH óptimo

En la Figura 20 se observa la relación entre la actividad proteolítica de MP10 (expresada como absorbancia a 340 nm) y el pH de reacción. El ensayo se realizó a temperatura constante de 37 °C. Del gráfico de “Absorbancia vs pH”, se desprende

que MP10 tendría un pH óptimo de actividad en el entorno de 8, coincidiendo con lo esperado para una proteasa alcalina.

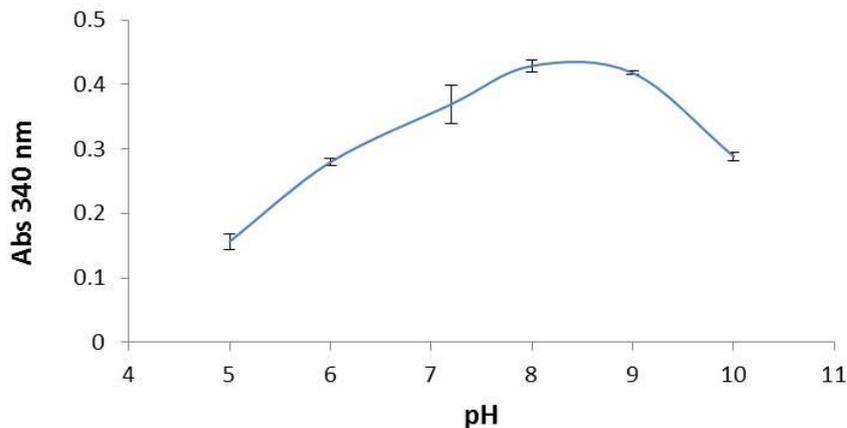


Figura 20. Curva de actividad proteolítica (expresada como valor de Absorbancia a 340 nm) vs pH de reacción. Cada punto representa la media de tres réplicas experimentales. El experimento se realizó dos veces, mostrando siempre la misma tendencia. Se muestra el resultado de uno solo de estos experimentos. Las barras verticales representan la desviación estándar de los experimentos independientes.

Efecto de la temperatura sobre la actividad de MP10

El estudio de la dependencia de la actividad proteolítica de MP10 con la temperatura (Figura 21) mostró que en las condiciones del ensayo, la mayor actividad se obtuvo realizando el ensayo a 40 °C. La temperatura seleccionada para realizar todos los ensayos fue 37 °C, la actividad de MP10 representa un 66.5% del máximo valor. La actividad específica de MP10 a 37 °C fue de 109.7 UE/mg.

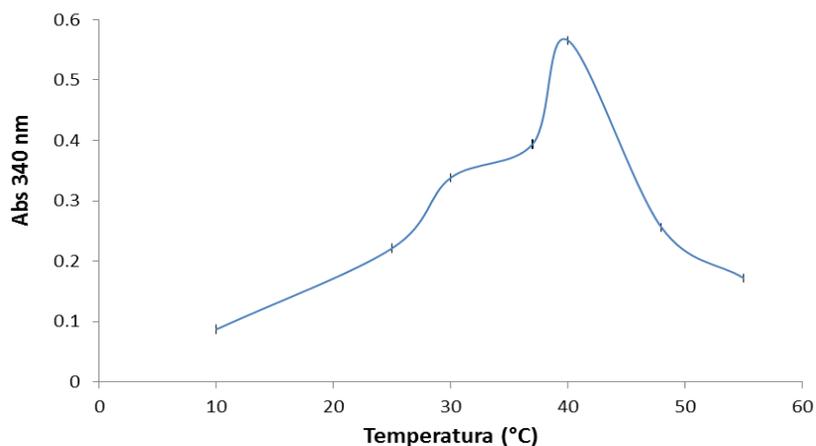


Figura 21. Curva de actividad (expresada como valor de Absorbancia 340nm) vs Temperatura. Cada punto representa la media de tres replicas experimentales. El experimento se realizó dos veces, mostrando siempre la misma tendencia. Se muestra el resultado de uno solo de estos experimentos. Las barras verticales representan la desviación estándar.

Se determinó también que luego de 20 min de incubación de MP10 a 45 °C (estabilidad a 45 °C), no se registra actividad residual de la proteasa recombinante. Esto sugiere que la exposición de MP10 a tiempos superiores a 20 min ocasiona la desnaturalización de la proteasa.

Inhibición de MP10 con EDTA

Como era de esperar para una metalo-proteasa, la actividad de MP10 se inhibió por la presencia del agente quelante EDTA (Tabla 6). A una concentración final de 50 mM del quelante se detectó una disminución drástica en la actividad de la enzima.

Tabla 6. Efecto de diferentes compuestos sobre la actividad de MP10

Compuesto	Concentración final (mM)	Actividad residual (%)
EDTA	5	50.2
	10	36.7
	50	1.4
Ninguno	----	100.0

IX. Producción y purificación de la proteasa MP10 nativa a partir del cultivo de *Pseudomonas sp. AU10*

Con la finalidad de obtener proteína nativa para utilizar en un estudio de comparación con la enzima recombinante se decidió explorar más a fondo la posibilidad de producirla y purificarla directamente a partir del sobrenadante del cultivo del aislamiento Antártico.

Al inicio del trabajo de esta tesis se había analizado el sobrenadante del cultivo de AU10 crecido en medio LB (sin el agregado de leche) a baja temperatura, y no se había detectado a la proteasa (ausencia de actividad proteolítica y de la enzima de 50 kDa en ensayos de SDS-PAGE), concluyéndose entonces que en las condiciones de trabajo ensayadas era necesaria la presencia de la leche para que la enzima se produjera y/o secretara al medio extracelular. Un análisis más detallado de la bibliografía permitió encontrar el reporte de otro medio de cultivo, medio PFm,

para la producción de proteasas siccófilas de *Pseudomonas* (Chessa et al, 2000). Se analizó entonces la posibilidad de la producción y secreción de MP10 en este medio de cultivo. En la Figura 22 se muestra la curva de crecimiento del aislamiento AU10 en PFm, a 13 °C. Mediante el análisis por SDS-PAGE y zimograma a 4°C del sobrenadante del cultivo a diferentes tiempos de crecimiento, se detectó que la proteasa se produce y secreta durante la fase exponencial temprana del crecimiento de microorganismo.

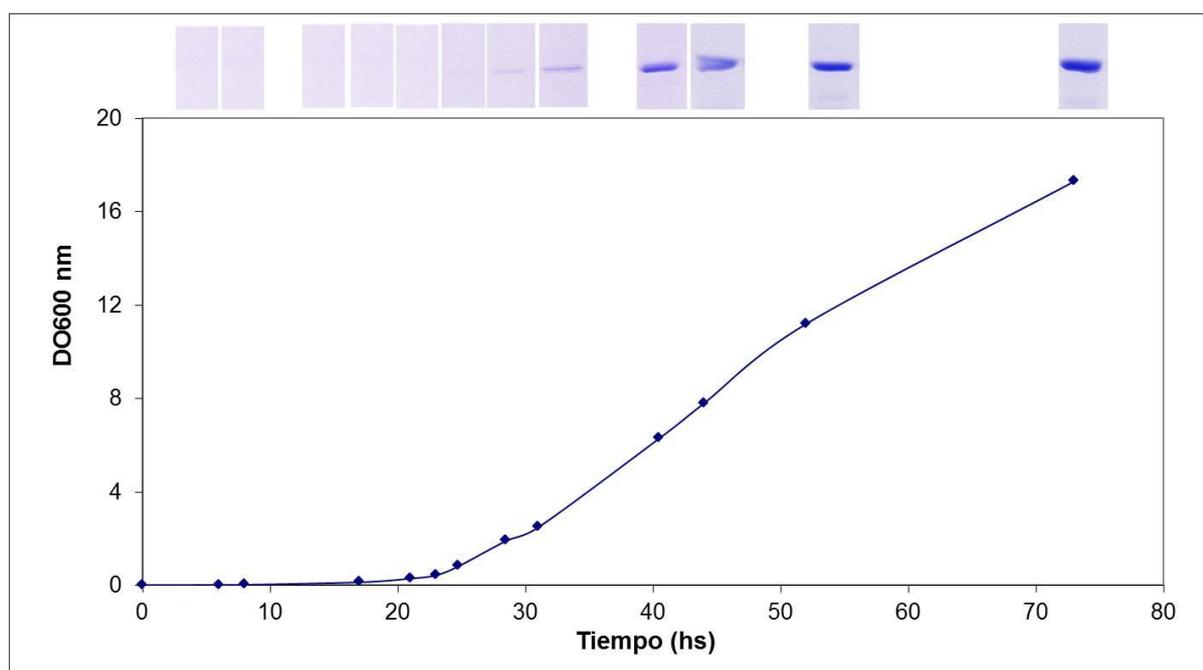


Figura 22. Crecimiento de *Pseudomonas* sp. AU10 en medio PFm a 13 °C. Se muestra la curva de crecimiento del aislamiento y en la zona superior el resultado del análisis por SDS-PAGE del sobrenadante del cultivo, mostrando la aparición de la proteína MP10.

Para la purificación de la enzima desde el sobrenadante libre de células se realizó una cromatografía de intercambio aniónico, cuyo resultado se muestra en la Figura 23A. Dicho sobrenadante presenta además de la proteasa MP10 (banda proteica de aproximadamente 50 kDa) otras bandas proteicas de mayor y menor masa molecular. Las mismas pueden corresponder a otras proteínas secretadas, proteínas intracelulares liberadas por células lisadas o incluso degradación proteolítica por parte de la proteasa MP10. Como se observa en la Figura 23A el intercambio iónico no permitió separar la proteasa del resto de las proteínas presentes en la muestra. De hecho, gran parte de la proteasa eluyó en el percolado. Probablemente, en las condiciones analizadas, se superó la capacidad del intercambiador. También es posible que la producción de exopolisacáridos (que se sabe es abundante en bacterias marinas y se ha demostrado que incrementa en este aislamiento particular cuando crece a baja temperatura) hayan interferido con la unión de la proteína a la fase estacionaria compitiendo por los grupos cargados de la matriz.

En la segunda etapa cromatográfica se utilizó el percolado del intercambio aniónico para realizar una cromatografía de afinidad utilizando una resina cargada con $ZnSO_4$. En la Figura 23B se muestra el perfil proteico del eluato de dicha cromatografía, donde se observa únicamente la proteína MP10 de 50 kDa.

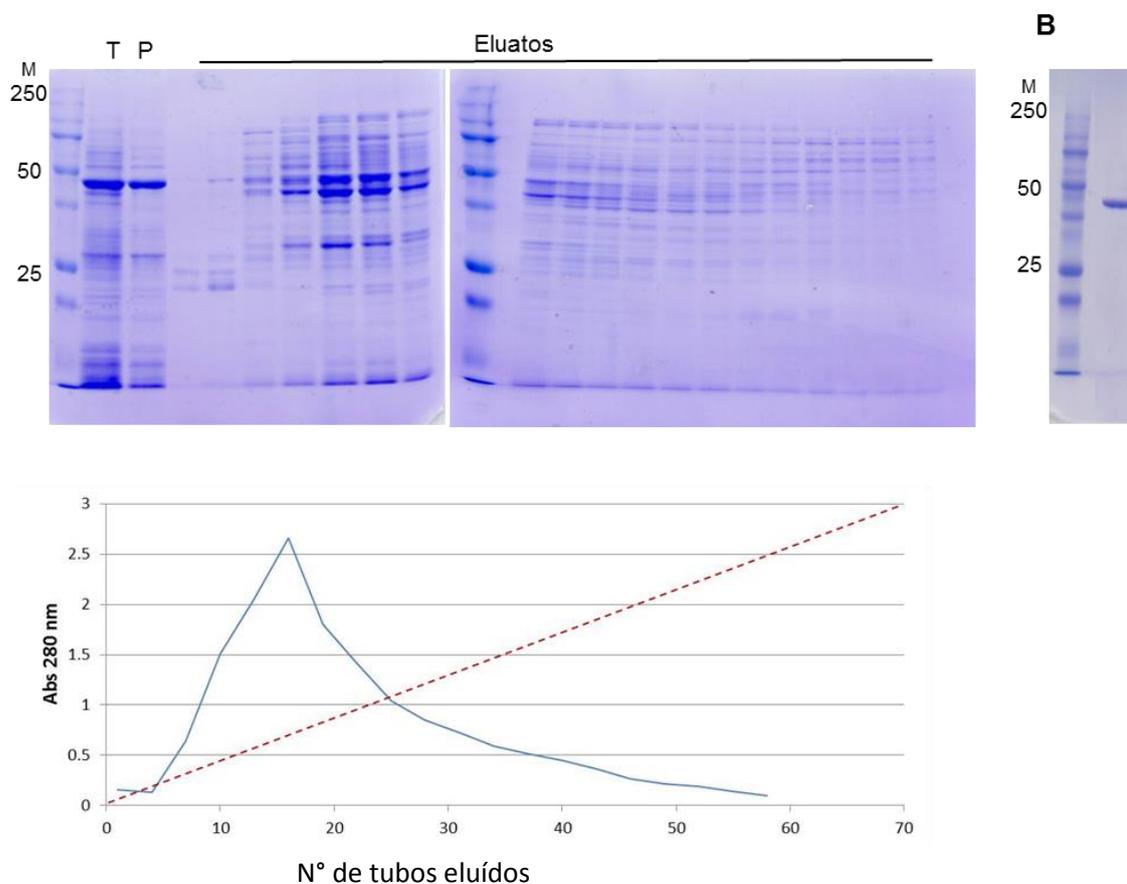


Figura 23. Purificación de MP10 nativa. **A)** Se muestra las fracciones obtenidas en el intercambio aniónico. Se sembró la fracción total (T) correspondiente al sobrenadante filtrado del cultivo de *Pseudomonas* sp. AU10, el percolado (P) y las fracciones eluidas. Se muestra abajo el cromatograma donde se registra la Absorbancia 280nm de los eluatos (línea azul). **B)** Eluato de la cromatografía de afinidad. Se utilizó el marcador de peso molecular *Precision Plus Protein™ All Blue Standards* (BIO-RAD).

X. Espectros de dicroísmo circular (DC) de MP10 nativa y recombinante

Mediante la obtención del espectro de DC en el UV lejano se determinó que la proteasa recombinante obtenida mediante plegamiento *in vitro* no presenta diferencias significativas en su conformación con respecto a la enzima nativa. Como se observa en la Figura 24A, ambos espectros coinciden en la mayoría de los puntos, con la excepción de la región 185 – 200 nm. En esta región la elipticidad de la proteína recombinante fue menor. Esto podría explicarse considerando el espectro característico de una proteína con conformación ovillo aleatorio, que presenta un valle en esta región del espectro (Figura 24B). De modo que posiblemente la diferencia observada en el espectro de ambas proteínas se debe a la contribución de una proporción de proteína recombinante desnaturalizada.

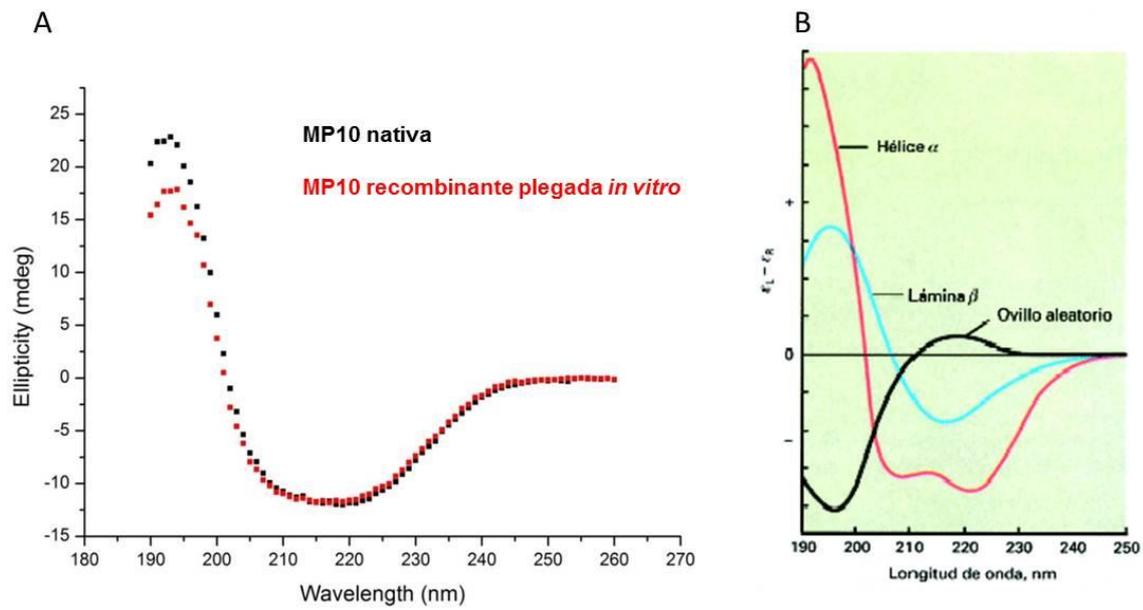


Figura 24. Estudio comparativo de la conformación de MP10 recombinante y nativa por Discoísmo Circular (DC). **A)** Se muestra el espectro DC de la proteína nativa (puntos negros) y la recombinante re plegada (puntos rojos). Se grafica la elipticidad recogida en función de la longitud de onda en nm. **B)** Espectro de DC característico de una proteína formada con conformación hélice α , lámina β u ovillo aleatorio

Discusión

Identificación de la proteína MP10 y su gen codificante

Pseudomonas sp. AU10 es un microorganismo sicro-tolerante (crece entre 4 y 30 °C) aislado en la península Antártica (Martínez-Rosales & Castro-Sowinski, 2011), un ambiente en el cual la temperatura oscila entre -10 °C y 10 °C. Por lo tanto, es de esperar que las enzimas producidas por este microorganismo se encuentren adaptadas al frío y sean eficientes catalizadores a bajas temperatura.

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que la metalo-proteasa MP10 producida por este aislamiento antártico es la única proteasa extracelular (aproximadamente 50kDa) producida en las condiciones ensayadas (coagulación de las proteínas lácteas). La producción de una sola proteasa extracelular de aproximadamente 50kDa, en condiciones similares a las utilizadas en este trabajo, también se informó para aislamientos de *Pseudomonas* sp. y *P. fluorescens* (Nicodeme et al 2005; Dofour et al 2008).

Considerando que MP10 se identificó en el sobrenadante filtrado (libre de células) proponemos que esta proteína se secreta y que no estaría asociada a la membrana/pared de la bacteria. Este resultado se respalda también en la demostración de que el filtrado es capaz de hidrolizar las proteínas lácteas, en ensayos donde se colocaron gotas del mismo sobre placas de petri conteniendo medio ML.

La identificación del gen responsable de la producción de MP10 mediante PCRi permitió obtener la secuencia codificante de MP10 y parte de su contexto génico. El tamaño molecular teórico de MP10 sería de 49.368Da, coincidiendo con la masa aparente de 50kDa observado por SDS-PAGE. MP10 comparte un elevado porcentaje de identidad (>90%) con metalo-proteasas de diferentes especies de *Pseudomonas* (principalmente *P. fluorescens* y *P. tolaasi*) y se clasificó según la base de datos MEROPS, como miembro de la familia M10B, identificándose el motivo conservado HEXXHXXGXXH característico de la familia. En MP10, este motivo está formado por los aminoácidos H₁₈₃, E₁₈₄, H₁₈₇, G₁₉₀ e H₁₉₃. Según la comparación con proteasas caracterizadas, los residuos de His así como también la Tyr₂₂₃ serían los ligandos para el átomo del metal catalítico (probablemente zinc). A su vez, MP10 pertenecería al clan de las metzincinas, compuesto por metalo-proteasas que presentan similitud a nivel estructural, aunque no necesariamente a nivel de secuencia primaria. Las metalo-proteasas que conforman este clan se caracterizan por poseer una Met conservada (Met₂₂₁ en MP10) localizada en un giro β (Met-turn) próximo al sitio catalítico; sin embargo, el reemplazo de la Met₂₁₄ en la proteasa AprA en otras *Pseudomonas*, por aminoácidos no naturales (L-difluoro metionina), no demostró efectos sobre la estructura y función de la proteasa (Gomis-Rüth 2003), restándole importancia.

Existen más de 700 proteasas que se han clasificado como metzincinas, producidas tanto por bacterias, plantas y animales. Estas proteasas incluyen las matrixinas (se

secretan al espacio extracelular, participan en la remodelación del pulmón fibrótico; un ejemplo son las gelatinazas y elastasas), las astacinas (digestión, regulación y procesamiento peptídico), las reprotinas (en veneno de serpientes; responsable de los efectos hemorrágicos y necrosis tisular), esnapalinas (secretadas por *Streptomyces*), las leishmanolisinas (unida a membrana, presente en protozoarios parasíticos) y las serralisinas (proteasas alcalina; donde AprA es un ejemplo en *Pseudomonas*) (Walasek & Honek, 2005).

Los estudios estructurales realizados con distintas metalo-proteasas homólogas de la familia M10B, de diferentes organismos, han permitido afirmar que estas proteínas presentan dos dominios: i) un dominio N-terminal, que contiene el sitio catalítico y ii) un dominio estructural C-terminal, que posee las señales de secreción y sitios de unión a calcio (Baumann et al 1993, Baumann 1994, Aghajari et al 2003, Zhang et al 2011). Si bien no disponemos de la estructura cristalográfica de MP10, proponemos que MP10 poseería esta estructura de dos dominios.

Todas las proteasas de esta familia se sintetizan como precursores inactivos, que se activan mediante la hidrólisis de sus pro-péptidos. Por comparación con otras proteasas se identificó un posible sitio de hidrólisis en MP10, conservado en otras proteasas de la familia. Por lo tanto, MP10 poseería un pro-péptido en el extremo N-terminal, que estaría constituido por 16 aminoácidos. En este trabajo no se estudió las condiciones necesarias para su hidrólisis y consecuente activación de la enzima, o si se activa por autoproteólisis.

La gran mayoría de las proteínas de la familia M10B cumplen funciones extracelulares; en especies de *Pseudomonas* que son patógenos oportunistas (como *Pseudomonas aeruginosa*) estas proteasas son factores de virulencia necesarios para el establecimiento y persistencia de la infección (Ballok & O' Toole 2013), pero en *Pseudomonas* sp. AU10, un aislamiento antártico ambiental, creemos que MP10 cumpliría básicamente funciones nutricionales. Esta afirmación se fundamenta en los resultados de Liao y MacCallus (1998), quienes demostraron que mutantes (obtenidas por inserción del transposón Tn5) de la metalo-proteasa extracelular AprX de *P. fluorescens* CY091 no pueden degradar proteínas lácteas y gelatina, cuando estos se utilizan como fuente de nitrógeno.

El análisis por comparación de la composición aminoacídica de MP10 y la metalo-proteasa homóloga de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, un microorganismo mesófilo, revela algunas características propias de las enzimas adaptadas al frío. En este sentido se registró un aumento en el número de Gly y una disminución en el número de Pro y aminoácidos que forman parte de puentes salinos tendientes a estabilizar la estructura proteica. Este resultado va de acuerdo a la tendencia observada en enzimas psicrófilas, las cuales presentan estructuras más flexibles que sus homólogas mesófilas (Russell et al 1998, Mandelman et al 2001, D'Amico 2002 et al, Aghajari et al 2003, Zhang et al 2011). No obstante no creemos prudente atribuir la actividad de MP10 a baja temperatura exclusivamente a estas modificaciones, siendo necesario un estudio cristalográfico para analizar a fondo la

estructura de la enzima y dilucidar modificaciones estructurales relacionadas con la disminución la rigidez de la estructura proteica, el incrementando de la flexibilidad local de la proteína y mayor eficiencia catalítica a baja temperatura. Estos estudios deberían además acompañarse de la obtención y caracterización de la proteína mutante, con sustituciones en los aminoácidos supuestamente implicados en su flexibilidad estructural.

El estudio del contexto en el cual se encuentra el gen codificante de la proteasa MP10 mostró que la misma se encuentra en una unidad transcripcional junto con un posible inhibidor de la proteasa y con los genes que codificarían la maquinaria de secreción. Este tipo de organización (a veces con variaciones en el orden en el que se encuentran los genes dentro del operón) ya se ha observado en otras bacterias Gram negativas como *Erwinia chrysanthemi*, *E. coli* y otras especies de *Pseudomonas* spp (Liao & McCallus 1998, Ahn et al 1999, Kawai et al 1999). Corriente abajo del inhibidor se encontró parte de la secuencia codificante de una proteína que presenta elevada homología con una proteína ABC (*ATP binding cassette*). Esta proteína, junto con una proteína de fusión de membrana y una de membrana externa, componen los sistemas de secreción tipo I (SSTI). Este sistema de secreción formaría un túnel continuo que atraviesa la membrana y el periplasma (Koster et al 2000, Thomas et al 2014). La proteína ABC reconoce el sustrato a través de las señales de secreción C-terminal GGXGXD (de las cuales se identificaron cuatro en

MP10) y es responsable de la especificidad del sistema de secreción. Si bien las bacterias Gram negativas poseen numerosos sistemas que le permiten transportar solutos a través de su membrana interna y externa, son el SSTI, así como el SSTIII y el SSTIV los tres sistemas que poseen para transportar proteínas a través de ambas membranas, en un único paso concertado (Yen et al, 2002; Ma et al 2003). A pesar de la similitud de secuencia entre los componentes de los sistemas ABC de diferentes bacterias, estos transportadores son específicos para la proteína o familia de proteínas que transportan (Thomas et al 2014).

El punto isoeléctrico teórico de MP10 es 4.78, encontrándose en el rango pI que presentan las proteínas secretadas por los SSTI (Zhang et al 2012). Considerando que MP10 se secreta al medio extracelular, la función del inhibidor puede resultar no evidente *a priori*. Sin embargo, se presume que su función en estas proteínas es vital para mantener inactiva a la enzima durante su pasaje por el espacio periplasmático, previniendo además la degradación proteolítica de otras proteínas (Hege et al 2001). Los estudios de cristalografía realizados por estos autores muestran que el extremo N-terminal del inhibidor forma un enlace de coordinación con el zinc catalítico, siendo esta interacción fundamental para la estabilidad del complejo proteasa-inhibidor. Estos autores también encontraron este tipo de interacción entre otros complejos metzincina-inhibidor. Siguiendo esta línea de pensamiento, se determinó en este trabajo que el inhibidor de MP10 posee un

péptido señal N-terminal de exportación, que sugiere una localización periplasmática del inhibidor, donde ejercería su función inhibitoria.

La producción de MP10 por *Pseudomonas* sp. AU10 sólo se detectó, en una primera instancia, en un medio de cultivo conteniendo leche descremada y cuando AU10 crecía a baja temperatura (entre 4 y 20 °C). En una etapa posterior a la producción recombinante), se comprobó que MP10 se producía y secretaba cuando el microorganismos se cultiva en el medio de cultivo PFM, detectándose su producción a partir de la fase exponencial temprana. Resultados similares obtuvieron Nicodeme et al (2005) y Dofour et al (2008) trabajando con diferentes *Pseudomonas*. Los trabajos de Nicodeme et al (2005) sugieren que la producción de proteasas extracelulares de diferentes *Pseudomonas* depende de las condiciones de cultivo, demostrando que el agregado de leche descremada al medio de cultivo induce de 10 a 20 veces la expresión de las proteasas en estudio. Existe evidencia para otras metalo-proteasas extracelulares producidas por *Pseudomonas* spp. de que su expresión está regulada negativamente por la presencia de hierro (Munsell et al 2005). Dicha evidencia indica que la transcripción de los genes involucrados en la síntesis y secreción de estas proteasas estaría controlada por un factor sigma tipo ECF (del inglés *Extracytoplasmic function*) de respuesta a hierro (Burger et al 2000, Woods et al 2001, Munsell et al 2005) alternativo al factor σ^{70} tradicional. Las células bacterianas utilizan estos factores sigma ECF para alterar su

perfil transcripcional en respuesta a diferentes estímulos ambientales (Thakur et al 2013) y su actividad está regulada por una proteína de membrana interna que actúa como sensor, permitiendo una respuesta adaptativa frente a un cambio ambiental (Potvin et al 2007). Si bien la producción de MP10 sólo se detectó cuando el aislamiento se cultiva (ya sea en medio ML o PFm) a menos de 30 °C, no se ha reportado en la bibliografía evidencias concretas de que la temperatura ejerza algún tipo de regulación de la expresión en enzimas homologas a MP10 en *Pseudomonas*. No excluimos la posibilidad de que a 30°C la enzima se sintetice, pero que no se secrete debido a los cambios en la composición, y por ende fluidez, de la membrana (uno de los mecanismos observados como adaptación a la vida baja temperatura). Estos cambios comprometerían el correcto ensamble de la maquinaria de secreción, impidiendo la exportación de MP10. Más allá de los resultados obtenidos en esta tesis, y la información aportada por otros trabajos, consideremos que no existe suficiente evidencia para sugerir si MP10 es una enzima de expresión constitutiva o si su expresión se induce por algún estímulo particular.

Producción recombinante de MP10

Durante este trabajo también se realizó una primera aproximación a la expresión recombinante de MP10. Se optó por la producción intracelular de MP10 en *E. coli* utilizando un vector de expresión de la serie pET, sistema que ha sido utilizado para

la producción de otras proteasas activas en frío (ver Tabla 2 de Introducción). Considerando que se desconoce si el pro-péptido de MP10 tiene algún papel facilitador en el correcto plegamiento de la enzima como ocurre con otras proteasas, por ejemplo catepsinas (Li et al 1995, Cappetta et al 2002), se decidió clonar y producir la enzima manteniendo el mismo. A su vez, para facilitar la purificación de la enzima se incluyó una cola de 6xHis; la misma se colocó en el extremo C-terminal para evitar que se perdiera al hidrolizarse el pro-péptido durante la maduración de la enzima. Como era de esperar, la producción intracelular de MP10 en *E. coli* (DE3) BL21 (realizando la inducción a 30 °C) resultó tóxica para la cepa, observándose que la cepa recombinante presentaba dificultad para crecer, aun sin el agregado del inductor IPTG. Esto sugiere que los niveles basales de expresión de esta enzima proteolítica (debido a fugas en la represión del sistema que ocasionan niveles basales de transcripción de la polimerasa desde el promotor *lacUV5* y en consecuencia del gen blanco) son deletéreos para la célula. La utilización de las cepas de expresión de *E. coli* C41 y C43 (frecuentemente utilizadas para la expresión de genes tóxicos) permitió obtener niveles significativos de la enzima recombinante (siendo mayor la producción en C41), sin efectos significativos en el crecimiento celular a 30°C.

MP10 recombinante se acumuló siempre en los cuerpos de inclusión, tal cual se ha observado para diferentes enzimas proteolíticas (ver punto VI de Introducción). La

formación de agregados conteniendo proteína recombinante mal plegada es un problema frecuentemente encontrado al producir proteínas recombinantes en *E. coli*, y es una consecuencia esperable considerando que una proteasa podría ser una molécula potencialmente tóxica para la célula. En este sentido, se observó que al intentar mejorar la solubilidad de MP10 mediante la inducción de la expresión a 12 °C, se aumenta la expresión de MP10 en forma activa en la fracción soluble; sin embargo, también se detectó que el cultivo se lisaba (disminución de turbidez con el tiempo), sugiriendo una vez más que la producción de MP10 activa soluble, sólo es posible a partir de su purificación desde los cuerpos de inclusión y posterior plegamiento *in vitro*.

Los ensayos de expresión con la cepa C41 transformada con pDIA17 (plásmido utilizado para reforzar la represión del sistema T7) a 37 °C y plegamiento *in vitro* de MP10 permitieron obtener 1.5 mg de MP10 recombinante por litro de cultivo de *E. coli*. Una de las ventajas de la formación de cuerpos inclusión es que frecuentemente estos agregados contienen casi exclusivamente la proteína recombinante (Speed et al 1996). En este sentido, recuperando los cuerpos de inclusión se puede llegar a obtener con relativa facilidad, según el caso, la proteína con un bajo nivel de contaminantes.

El análisis de las fracciones soluble e insoluble a través de la determinación de actividad proteolítica en forma espectrofotométrica no mostró actividad detectable

en ninguna de las fracciones. Sin embargo, los estudios en geles de actividad (o zimogramas) indicaron que los cuerpos de inclusión solubilizados presentan actividad proteolítica (a 4 °C) sobre el sustrato gelatina, sugiriendo la presencia de la enzima en forma activa. Este resultado podría explicarse porque durante la electroforesis nativa, en el ensayo de zimograma, MP10 estaría sufriendo un proceso de plegamiento *in vitro* (quizás facilitado por la retención de parte de la estructura nativa de la enzima).

En biotecnología la etapa crítica en la recuperación de proteína recombinante activa desde los cuerpos de inclusión es el replegamiento de la proteína. En el caso de MP10 la obtención de la enzima activa se logró mediante el plegamiento *in vitro* por el método de dilución rápida de los cuerpos de inclusión purificados. Este método implica la dilución simultánea de la proteína y el agente caotrópico utilizado. Este procedimiento es muy utilizado a nivel industrial debido a su simplicidad (Jungbauer & Kaar 2007). En el caso de MP10, se logró replegar la enzima en un tampón que tienen la misma composición que el tampón de lisis, pero suplementado con Ca^{++} . Se comprobó que el rendimiento en la recuperación de proteína soluble activa aumenta en presencia de Ca^{++} en el tampón de plegamiento, viéndose saturada a una concentración de 200 μM de Ca^{++} . El resultado sugiere que el ion calcio favorece el plegamiento de MP10. Un trabajo publicado acerca del estudio del plegamiento de la metalo-proteasa extracelular alcalina de *P. aeruginosa* (homóloga

mesófila de MP10) indicó que la presencia de calcio es determinante para el correcto plegamiento de esta enzima. El plegamiento *in vitro* de la enzima se iniciaría por el dominio C-terminal, el cual actuaría como núcleo para el posterior plegamiento del dominio catalítico N-terminal (Zhang et al 2012).

Purificación de MP10 y caracterización parcial de la enzima

Si bien la purificación de la proteasa recombinante fue exitosa, los resultados indican que podría existir degradación de la proteasa luego de la IMAC. La misma podría originarse por autoproteólisis o por acción de otras proteasas, durante el procedimiento de lisis y purificación de cuerpos de inclusión. Los resultados de Western blot sugieren que la degradación ocurriría desde el extremo N-terminal. Sin embargo, es necesario explorar más a fondo la posibilidad de que MP10 tenga actividad autoproteolítica en las condiciones ensayadas; éste es un aspecto fundamental para cualquier enzima que se pretenda utilizar a nivel tecnológico/industrial. Actualmente se ha diseñado, mediante mutagénesis dirigida, una versión inactiva de la enzima MP10. En la misma se ha sustituido el residuo Glu₁₈₄ por una Gly (estos resultados no se incluyen en este trabajo). Se ha verificado que la versión mutante de MP10 no presenta actividad proteolítica y está pendiente el ensayo de producción recombinante y purificación para verificar la hipótesis de autoproteólisis.

Los ensayos preliminares de caracterización de MP10 se realizaron con la enzima recombinante. La actividad enzimática residual se redujo drásticamente (98.6 % de reducción de la actividad) tras el agregado de EDTA 50mM, confirmando que MP10 es una metalo-proteasa. La temperatura óptima de actividad de MP10, bajo las condiciones ensayadas, fue de 40 °C y el pH óptimo de actividad fue de 8, confirmando su identificación como una proteasa alcalina. Las enzimas catalogadas como psicófilas presentan sus máximos de actividad catalítica a temperaturas que son menores a las reportadas para sus homólogas mesófilas. En lo que refiere a la temperatura de actividad de MP10, ésta es significativamente menor que la temperatura óptima de su homóloga mesófila (metalo-proteasa de *Pseudomonas aeruginosa*) la cual presenta una temperatura óptima de 60 °C (Obernesser et al 1981). Comparando los datos obtenidos para MP10 con los de otras proteasas psicófilas reportadas en la literatura, provenientes de distintos microorganismos adaptados al frío (ver tabla 1) en las cuales las temperaturas de mayor actividad catalítica oscilan entre 15-40°C, podemos afirmar que MP10 presenta características propias de las enzimas psicófilas. Si bien MP10 presenta actividad a más baja temperatura (propiedad atractiva para su utilización en diferentes industrias), es necesario analizar más a fondo su estabilidad a altas temperaturas (característica de las enzimas adaptadas al frío).

La temperatura máxima de actividad de MP10, bajo las condiciones ensayadas, es 40°C, los ensayos de determinación de actividad se condujeron a 37°C (temperatura a la cual la enzima retiene 66.5% de actividad) durante 20 minutos. Se verificó que en estas condiciones se estaba en situación de velocidad inicial (relación de linealidad en la curva actividad vs. tiempo figura 19) sin pérdida de actividad enzimática (tras los 20 minutos de incubación) por inhibición por producto o inactivación térmica. No obstante se verificó que tras una incubación prolongada (realizada pre incubando MP10 a 40°C durante 20 minutos previos al ensayo de actividad, no se detecta actividad proteolítica. Si bien queda pendiente estudiar el efecto de tiempos menores de incubación sobre la actividad proteolítica de MP10, los resultados sugieren que MP10 se estaría inactivando como consecuencia de la exposición a temperaturas moderadas. La inestabilidad térmica es una característica que puede ser o no deseada según el proceso industrial a realizar. Tanto la actividad a baja temperatura como la estabilidad térmica son características que se intentan mejorar en enzimas sicrófilas con potencial tecnológico mediante evolución dirigida, sustituyendo aminoácidos para modificar estas características (Koutsuolis et al 2008, Zhong et al 2009). Esta estrategia de trabajo es una aproximación experimental que a su vez proporciona información valiosa acerca de las modificaciones que explican el carácter sicrófilico o termófilico de las enzimas extremófilas (Arnold et al, 2001).

Si bien queda pendiente completar la caracterización de esta enzima hidrolítica, incluyendo el análisis de actividad frente a un panel más amplio de sustratos, consideramos que tanto por su actividad en un rango amplio de temperatura (que incluye temperaturas bajas y moderadas), así como por su rápida inactivación térmica, MP10 podría ser interesante candidato para analizar su aplicación en la industria alimenticia o del detergente entre otras. Las posibles aplicaciones se discuten en la sección Introducción (Proteasas activas a bajas temperaturas – potencial tecnológico).

Producción de la enzima nativa

Durante las primeras etapas de este trabajo, la producción de MP10 en forma nativa sólo se había logrado en un medio suplementado con leche (Martínez-Rosales & Castro-Sowinski 2010), siendo ésta una de las razones que justificaba la estrategia de producción recombinante, como forma de obtener la proteína pura y en cantidad suficiente para su caracterización. Sin embargo, hacia el final de este trabajo se logró producir la enzima nativa creciendo a AU10 en un medio de cultivo (medio PFm) sin el agregado de leche. El mismo ya había sido utilizado exitosamente para la producción de otra metalo-proteasa de un aislamiento Antártico de *Pseudomonas* (Chessa et al 2000). La producción de la enzima se detectó desde el comienzo de la fase exponencial, cuando el aislamiento se cultiva a 7 °C. El medio PFm cuenta con triptona entre otros ingredientes. Curiosamente, la producción de la enzima se

detectó o no, dependiendo de la fuente comercial de la cual provenía la triptona. Cuando se utilizó triptona de los proveedores Sigma o Duchefa, no hubo producción de la enzima; sin embargo cuando se utilizó triptona de Difco, si hubo producción de MP10. Este resultado denota la importancia de estudiar la fuente comercial de cada ingrediente durante la producción de una enzima, sobre todo bajo la luz de su relevancia a nivel industrial, cuando cambiar el proveedor de un ingrediente puede significar el éxito o el fracaso de un proceso industrial.

La purificación de MP10 nativa mediante cromatografía de intercambio aniónico no fue exitosa, obteniéndose gran parte de la enzima en el percolado. *Pseudomonas* sp. AU10 incrementa la producción de exopolisacáridos (EPS), moléculas cargadas negativamente, al crecer a baja temperatura (comunicación personal; tesis de Maestría de Cecilia Martínez-Rosales). Los EPS podrían haberse unido a la resina aniónica utilizada, y así interferir con la unión de la proteasa a la misma. La producción de EPS es frecuente en bacterias marinas, en las cuales cumplen fines crioprotectores, proporcionando una matriz que previene la desnaturalización por frío de las proteínas secretadas (Nichols et al 2005). El pasaje por el intercambiador aniónico probablemente disminuyó la concentración de EPS del sobrenadante de cultivo. Para confirmarlo sería conveniente determinar el contenido de polisacáridos del medio antes y después del intercambio. La purificación de MP10 se mejoró posteriormente mediante una cromatografía de afinidad a zinc inmovilizado.

Contando con la enzima nativa (activa) purificada se pudo comparar mediante la obtención de los espectros de dicroísmo circular, la estructura de la enzima nativa y la recombinante. Se verificó que no existen diferencias significativas en la estructura de ambas, corroborando el correcto plegamiento de la enzima recombinante. Cabe recordar que la enzima recombinante posee una etiqueta de histidinas en su extremo C-terminal, y que el mismo no se eliminó antes de la obtención del espectro de dicroísmo circular, motivo por el cual, sugerimos que esta etiqueta no tendría un efecto relevante sobre la estructura de MP10. Por este motivo, se continuó la caracterización de la enzima sin la eliminación de la etiqueta.

Consideraciones generales

Este trabajo fue una primera aproximación a la producción de MP10, recombinante y también desde la fuente natural, que permitió avanzar en la caracterización parcial de MP10. Aún queda pendiente completar su caracterización bioquímica y definir su potencial para su uso por parte de algunas industrias. En este sentido, consideramos que la puesta a punto de un sistema recombinante que permita obtener grandes cantidades de proteína activa es necesario para la eventual transferencia de estas enzimas a nivel industrial. Esto es de particular importancia considerando las dificultades asociadas a la fermentación industrial con microorganismos sicrotolerantes o sicrófilos (alto consumo energético para mantener sistemas refrigerados durante periodos largos de tiempo) y también las dificultades

de trabajar con aislamientos que no están bioquímica, fisiológica y genéticamente caracterizados (contando en nuestro caso particular con una clasificación sólo a nivel de género y conociendo sólo algunas de las propiedades bioquímicas y fisiológicas de AU10). Además, desde el punto de vista sanitario, el uso de aislamientos de *Pseudomonas* puede resultar controversial, pues pueden comportarse como patógenos oportunistas. No obstante quizá sea posible, para muchos de los aislamientos antárticos sicro-tolerantes de nuestra colección, optimizar las condiciones de producción de la enzima (tiempo, temperatura y medios de cultivo) desde la fuente natural, de modo de obtener cantidades suficientes de proteína para evaluar su características bioquímicas y propiedades tecnológicas. De este modo sería posible definir con cuales enzimas es más conveniente avanzar hacia una producción recombinante.

Conclusión y perspectivas

En este trabajo se estudió la proteasa MP10 producida por el aislamiento antártico *Pseudomonas* sp. AU10. MP10 se identificó como una metalo-proteasa alcalina de secreción que es activa a baja temperatura. Presenta un máximo de actividad que se encuentra dentro del rango de temperaturas reportados para enzimas psicrófilas y que en particular es 20°C menor a la temperatura de mayor actividad catalítica reportada para la metalo proteasa homóloga mesófila de *P. aeruginosa*. La identificación de su gen codificante permitió ensayar su expresión recombinante en *E. coli*. Su producción recombinante sólo se logró mediante su acumulación en cuerpos de inclusión, debido posiblemente a que se trata de una enzima con actividad proteolítica. La obtención de la enzima activa se logró mediante su purificación desde los cuerpos de inclusión (solubilización con urea y posterior plegamiento mediante dilución rápida) por IMAC, obteniéndose finalmente la enzima en forma soluble y activa.

Se logró también purificar la enzima nativa, con la cual se pudo determinar, mediante dicroísmo circular, que la versión recombinante de MP10 no presenta diferencias significativas a nivel de estructura con la enzima nativa.

El análisis de su secuencia primaria y su caracterización parcial permitieron identificar varias características propias de las enzimas activas en frío. MP10 presenta en comparación con su homóloga mesófila mayor contenido de Gly y una disminución en aminoácidos implicados en la rigidez estructural (Pro, Arg), siendo su temperatura óptima de actividad catalítica menor que la observada para su homóloga mesófila.

Queda pendiente completar la caracterización de MP10, ampliando el estudio del efecto de diferentes compuestos sobre la actividad proteolítica de la enzima, así como la determinación de los parámetros cinéticos. A su vez, para determinar su potencial utilización en industrias como la del detergente se deberá analizar su actividad y estabilidad frente a compuestos oxidantes y surfactantes.

Dependiendo de la aplicación que se encuentre para esta enzima se buscará optimizar la producción recombinante en *E. coli* y en caso de encontrarle aplicaciones en la industria alimenticia se estudiarán otros sistemas de expresión. En este sentido se está explorando la posibilidad de producción recombinante en *Lactococcus lactis*, una bacteria Gram positiva, considera GRAS (del inglés: *genetically regarded as safe*).

Bibliografía

- Acevedo JP, Rodriguez V, Saavedra M, Muñoz M, Salazar O, Asenjo JA, Andrews BA (2013) Cloning, expression and decoding of the cold adaptation of a new widely represented thermolabile subtilisin-like protease. *J Appl Microbiol*, 114:352—363.
- Adam Z (2013) Emerging roles for diverse intramembrane proteases in plant biology. *Biochim Biophys Acta*, 1828:2933-2936. doi: 10.1016/j.bbamem.2013.05.013
- Adekoya OA, Helland R, Willassen NP, Sylte I (2006) Comparative sequence and structure analysis reveal features of cold adaptation of an enzyme in the thermolysin family. *Proteins*, 62: 435-449.
- Adrio JL, Demain AL (2014) Microbial Enzymes: Tools for Biotechnological Processes. *Biomolecules*, 4: 117-139. doi:10.3390/biom4010117.
- Ahn JH, Pan JG, Rhee JS (1999) Identification of the TliDEFABC transporter specific for lipase in *Pseudomonas fluorescens* SIK W1. *J Bacteriol* 181: 1847–1852.
- Aggarwal N, Sloane BF (2014) Cathepsin B: Multiple roles in cancer. *Prot Clin Appl*, 8: 427–437. doi: 10.1002/prca.201300105.
- Aghajari N, Feller G, Gerday C, Haser R (1998) Structures of the psychrophilic *Alteromonas haloplanctis* α -amylase give insights into cold adaptation at a molecular level. *Structure*, 6:1503–1516.
- Aghajari N, Van Petegem F, Villeret V, Chessa J-P, Gerday C, Haser R, Van Beeumen J (2003) Crystal structures of a psychrophilic metalloprotease reveal new insights into catalysis by cold-adapted proteases. *Proteins*, 50: 636–647. doi: 10.1002/prot.10264.
- Almog O, González A, Godin N (2009) The crystal structures of the psychrophilic subtilisin S41 and the mesophilic subtilisin Sph reveal the same calcium-loaded state. *Proteins*, 74: 489–496.

-
- Andrews BA & Asenjo JA (1986) Synthesis and regulation of extracellular α (1-3) glucanase and protease by *Cytophaga* sp. in batch and continuous culture. *Biotechnol Bioeng*, 28: 1366-1375.
 - Arnold, F.H., Wintrode, P.L., Miyazaki, K., and Gershenson, A. 2001. How enzymes adapt: Lessons from directed evolution. *Trends Biochem. Sci.* 26: 100–106
 - Arnórsdóttir J, Smáradóttir RB, Magnússon Ó Th, Thorbjarnardóttir SH, Eggertsson G, Kristjánsson MM (2002) Characterization of a cloned subtilisin-like serine proteinase from a psychrotrophic *Vibrio* species. *Euro J Biochem*, 269: 5536–5546. doi: 10.1046/j.1432-1033.2002.03259.x.
 - Ballok AE, O'Toole GA (2013) Pouring Salt on a Wound: *Pseudomonas aeruginosa* Virulence Factors Alter Na⁺ and Cl⁻ Flux in the Lung. *ASM*, 195:4013-4019.
 - Baumann U, Wu S, Flaherty KM, McKay DB (1993) Three-dimensional structure of the alkaline protease of *Pseudomonas aeruginosa*: a twodomain protein with a calcium binding parallel beta roll motif. *EMBO J.*12:3357–3364.
 - Baumann U (1994) Crystall structure of the 50kDa metallo protease from *Serratia marcescens*. *J Mol Biol*, 242:244-251
 - Burger M, Woods RG, McCarthy C, Beacham IR (2000) Temperature regulation of protease in *Pseudomonas fluorescens* LS107d2 by an ECF sigma factor and a transmembrane activator. *Microbiology*, 146: 3149-3155.
 - Arpigny JL, Feller G, Gerday C (1993). Cloning, sequence and structural features of a lipase from Antarctic Facultative Psychrophile Psychrobacter Immobilis B10. *Biochim Biophys Acta*, 1171: 331-333.
 - Binod P, Palkhiwala P, Gaikawai R, Nampoothiri KM, Duggal A, Dey K, Pandey A (2013) Industrial Enzymes – Present status and future perspectives for India. *J Sci Ind Res*, 72: 271-286.
 - Brenchley JE, Loveland-Curtze J, Gutshall K, Humphrey V (2001) Stain removing compositions containing particular isolated and pure proteolytic enzymes. Patent N° US6326346.
-

-
- Brunialti EA, Gatti-Lafranconi P, Lotti M (2011) Promiscuity, stability and cold adaptation of a newly isolated acylaminoacyl peptidase. *Biochimie* 93: 1543–1554. doi: 10.1016/j.biochi.2011.05.010
 - Cappetta M, Roth I, Díaz A, Tort J, Roche L (2002) Role of the prosegment of *Fasciola hepatica* cathepsin L1 in folding of the catalytic domain. *Biol Chem*, 383:1215-21.
 - Chen R (2011) Bacterial expression systems for recombinant protein production: *E. coli* and beyond. *Biotechnol Adv*, 30:1102-1107.
 - Chessa JP, Petrescu I, Bentahir M, Van Beeumen J, Gerday C (2000). Purification, physico-chemical characterization and sequence of a heat labile alkaline metalloprotease isolated from a psychrophilic *Pseudomonas* species. *Biochim Biophys Acta*, 1479: 265-274
 - Cho IH, Choi ES, Lim HG, Lee HH (2004) Purification and Characterization of Six Fibrinolytic Serine-Proteases from Earthworm *Lumbricus rubellus*. *J Biochem Mol Biol*, 37:199-205.
 - Cowan DA, Makhalanyane TP, Dennis PG and Hopkins DW (2014) Microbial ecology and biogeochemistry of continental Antarctic soils. *Front Microbiol* 5:154. doi: 10.3389/fmicb.2014.00154
 - Dalev PG (1994) Utilization of waste feathers from poultry slaughter for production of a protein concentrate. *Bioresour Technol*, 48:265-267
 - D'Amico S, Claverie P, Collins T, Georlette D, Gratia E, Hoyoux A, Meuwis M-A, Feller G, Gerday C (2002) Molecular basis of cold adaptation. *Phil Trans R Soc Lond*, 357:917-925.
 - D'Amico S, Collins T, Marx J-C, Feller G, Gerday C (2006) Psychrophilic microorganisms: challenges for life. *EMBO Rep*, 7: 385–389. doi: 10.1038/sj.embor.7400662 PMID: PMC1456908.
 - D'Amico S, Marx JC, Gerday C, Feller G (2003) Activity–stability relationships in extremophilic enzymes. *J Biol Chem* 278: 7891–7896.
 - Damare C, Raghukuma C, Muraleedharan UD, Raghukumar S (2006) Deep-sea fungi as a source of alkaline and cold-tolerant proteases. *Enzyme Microb Tech*, 39:172-181.
-

-
- Dan D, Zhang D, Liu W, Lu C, Zhang T (2014) Diversity Analysis of Bacterial Community from Permafrost Soil of Mo-he in China. *Indian J Microbiol*, 54:111-113.
 - de Pascale D, Giuliani M, de Santi C, Bergamasco N, Amoresano A, Carpentieri A, Parrilli E, Tutino ML (2010) PhAP protease from *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125: Gene cloning, recombinant production in *E. coli* and enzyme characterization. *Polar Sci*, 4: 285–294.
 - Dufour D, Nicodeme M, Perrin C, Driou A, Brusseau E, Humbert G, Gaillard J-L, Dary A (2008) Molecular typing of industrial strains of *Pseudomonas* spp. Isolated from milk and genetical and biochemical characterization of an extracellular protease produced by one of them. *Int J Food Microbiol*, 125:188-196.
 - Dong D, Ihara T, Motoshima H, Watanabe K (2005), Crystallization and preliminary X-ray crystallographic studies of a psychrophilic subtilisin-like protease Apa1 from Antarctic *Pseudoalteromonas* sp. strain AS-11. *Acta Cryst*, F61, 308-311.
 - Feller G (2013). Psychrophilic Enzymes: From folding to Function and Biotechnology. Scientifica vol. 2013, Article ID 512840, 28 pages, doi:10.1155/2013/512840
 - Feller G, Gerday C (2003) Psychrophilic enzymes: hot topics in cold adaptation. *Nat Rev Microbiol*, 1: 200-208.
 - Fornbacke M, Clarsund M. (2013) Cold-Adapted Proteases as an Emerging Class of Therapeutics. *Infect Dis Ther*, 2: 15-26. DOI 10.1007/s40121-013-0002-x.
 - Garcia da Silveira G, Monteiro de Oliveira G, Ribeiro EJ, Monti R, Contiero J (2005) Microbial rennet produced by *Mucor miehei* in aolid-atate and aubmerged fermentation. *Braz Arch Biol Technol*, 48: 931-937.
 - Giuffrida P, Biancheri P, MacDonal, TT (2014) Proteases and amall intestinal barrier function in health and disease. *Curr Opin Gastroen*, 30: 147-153.
-

-
- Godinho VM, Furbino LE, Santiago IF, Pellizzari FM, Yokoya NS, Pupo D, Alves TM, Junior PA, Romanha AJ, Zani CL, Cantrell CL, Rosa CA, Rosa LH (2013) Diversity and bioprospecting of fungal communities associated with endemic and cold-adapted macroalgae in Antarctica. *ISME J*, 7: 1434-1451. doi: 10.1038/ismej.2013.77
 - Gomis-Rüth FX (2003) Structural Aspects of the Metzincin Clan of Metalloendopeptidases. *Mol Biotechnol*, 24:157-202.
 - Gonçalves V N, Vaz ABM, Rosa CA, Rosa LH (2012) Diversity and Distribution of Fungal Communities in Lakes of Antarctica. *FEMS Microbiol Ecol*, 82: 459–471. doi: 10.1111/j.1574-6941.2012.01424.x
 - Grzymiski JJ, Carter BJ, DeLong EF, Feldman RA, Ghadiri A & Murray AE (2006) Comparative Genomics of DNA Fragments from Six Antarctic Marine Planktonic Bacteria. *Appl Environ Microbiol* 72: 1532–1541.
 - Gupta R, Beg QK, Lorenz P (2002) Bacterial Alkaline Proteases: Molecular Approaches and Industrial Applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, 59: 15-32.
 - Gupta R, Gupta K, Saxena RK, Khan S (1999) Bleach-stable, Alkaline Protease from *Bacillus* sp. *Biotechnol Lett*, 21:135-138.
 - Guzzo J, Pages JM, Duong F, Lazdunski A, Murgier M (1991) *Pseudomonas aeruginosa* Alkaline Protease: Evidence for Secretion Genes and Study of Secretion Mechanism. *J Bacteriol*, 173:5290–5297.
 - Haard NF, Patel TR (1987) US Patent 4690826.
 - Hasan AKMQ, Tamiya E (1997) Cold-active Protease CP-58 and Psychrotrophic Bacteria. Patent N°WO9730172.
 - Hasan AKMQ, Tamiya E (1998) Cold-active Protease CP-70. Patent N° US6200793.
 - Hedstrom L (2002) Serine Protease Mechanism and Specificity. *Chem Rev*, 102: 4501-4523.
 - Hege T, Feltzer RE, Gray RD, Baumann U (2011) Crystal Structure of a Complex Between *Pseudomonas aeruginosa* Alkaline Protease and its Cognate Inhibitor: Inhibition by a zinc-NH₂ Coordinative Bond. *J Biol Chem*, 276: 35087-35092.
-

-
- Huston AL 2008. Biotechnological Aspects of Cold-Adapted Enzymes. En: Margesin R, Schinner F, Marx JC, Gerday C Psychrophiles: from Biodiversity to Biotechnology. Springer Berlin Heidelberg, 4:347-363.
 - Infante I, Morel MA, Ubalde MC, Martínez-Rosales C, Belvisi S, Castro-Sowinski S (2010) Wool-degrading Bacillus Isolates: Extracellular Protease Production for Microbial Processing of Fabrics. *World J Microb Biot*, 26: 1047-1052.
 - Inoue H, Nojima H, Okayama H (1990) High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids. *Gene* 96: 23-28.
 - Johns GC, Somero GN (2004). Evolutionary Convergence in Adaptation of Proteins to Temperature: A4-Lactate Dehydrogenases of Pacific Damselfishes (Chromis spp.). *Mol Biol Evol*, 21:314–320. DOI: 10.1093/molbev/msh021.
 - Jonsdottir G, Bjarnason JB, Gudmundsdottira A (2004) Recombinant cold-adapted trypsin I from Atlantic cod- expression, purification, and identification. *Protein Expres Purif*, 33:110–122.
 - Joshi S, Satyanarayana T(2013) Biotechnology of Cold-Active Proteases. *Biology*, 2: 755-783.
 - Jung W, Gwak Y, Davies PL, Kim JK, Jin E (2014). Isolation and Characterization of Antifreeze Proteins from the Antarctic Marine Microalga Pyramimonas gelidicola. *Mar Biotechnol*, doi10.1007/s10126-014-9567-Y.
 - Jungbauer A, Kaar W (2007) Current status of technical protein refolding. *J Biotechnol*, 128:587-596.
 - Kasana RC (2010) Proteases from psychrotrophs: an overview. *Crit Rev Microbiol*, 36:134-45
 - Kawai E, Idei A, Kumura H, Shimazaki K, Akatsuka H, Omori K (1999) The ABC exporter genes involved in the lipase secretion are clustered with the genes for lipase, alkaline protease, and serine protease homologues in Pseudomonas fluorescens . *Biochim Biophys Acta*, 1446:377–382.
-

-
- Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z (2010) Matrix Metalloproteinases: Regulators of the Tumor Microenvironment. *Cell*, 141: 52–67. doi:10.1016/j.cell.2010.03.015.
 - Khairullin RF, Mikhailova AG, Sebyakina TY, Lubenets NL, Ziganshin RH, Demidyuk IV, Gromova TY,
 - Koka R, Weimer BC (2000) Isolation and characterization of a protease from *Pseudomonas fluorescens* RO98. *J Appl Microbiol*, 89: 280-288.
 - Koster M, Bitter W, y Tommassen J (2000). Protein secretion mechanisms in Gram-negative bacteria. *Int J Med Microbiol* 290:325-331.
 - Kostrov SV, Rumsh LD (2009) Oligopeptidase B from *Serratia proteamaculans*. I. Determination of primary structure, isolation, and purification of wild-type and recombinant enzyme variants. *Biochem (Moscow)*, 74: 1164-1172.
 - Koutsioulis D, Wang E, Tzanodaskalaki M, Nikiforaki D, Deli A, Felle G, Heikinheimo P, Bouriotis V (2008) Directed evolution on the cold adapted properties of TAB5 alkaline phosphatase. *Protein Eng Des Sel*, 21:319-327
 - Kudrya VA, Simonenko IA (1994) Alkaline serine proteinase and lectin isolation from the culture fluid of *Bacillus subtilis*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 41:505-509.
 - Kulakova L, Galkin A, Kurihara T, Yoshimura T, Esaki N (1999) Cold-active serine alkaline protease from the psychrotrophic bacterium *Shewanella* strain ac10: gene cloning and enzyme purification and characterization., 65:611-617.
 - Li Y, Hu Z, Jordan F. and Inouye, M. (1995) Functional analysis of the propeptide of subtilisin E as an intramolecular chaperone for protein folding. Refolding and inhibitory abilities of propeptide mutants. *J Biol Chem* 270: 25127–25132
 - Liao CH, Maccallus DE (1998) Biochemical and genetic characterization of an extracellular protease from *Pseudomonas fluorescens* CY 091. *Appl Environ Microbiol*, 64:914-921.
-

-
- Ma Q, Zhai Y, Schneider JC, Ramseier TM, Saier Jr MH (2003) Protein secretion system of *Pseudomonas aeruginosa* and *P. fluorescens*. *Biochim Biophys Acta*, 1611:223-233.
 - Mancuso Nichols C, Lardièrre SG, Bowman JP, Nichols PD, Gibson JAE, Guézennec J (2005) Chemical Characterization of Exopolysaccharides from Antarctic Marine Bacteria. *Microbial Ecol*, 49, 578-589.
 - Margesin R (2002). Cold active enzymes as new tools in Biotechnology. En Gerday C (ed) *Extremophiles. Encyclopedia of life support systems*. EOLSS, Oxford.
 - Margesin R, Miteva V (2011). Diversity and ecology of psychrophilic microorganisms. *Res Microbiol*, 162: 346-361.
 - Mekkes JR, Le Poole IC, Das PK, Bos JD, Westerhof (1998) Efficient debridement of necrotic wounds using proteolytic enzymes derived from Antarctic krill: a double-blind, placebo-controlled study in a standardized animal wound model. *Wound Repair Regen*, 6:50-57.
 - Mandelman D, Bentahir M, Feller G, Gerday C, Haser R (2001) Crystallization and preliminary X-ray analysis of a bacterial psychrophilic enzyme, phosphoglycerate kinase. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 57: 1666-1668.
 - Martínez-Rosales C, Castro-Sowinski S (2011) Antarctic bacterial isolates that produce cold-active extracellular proteases at low temperature but with activity and stability at high temperature. *Polar Res*, 30. DOI:10.3402/polar.v30i0.7123
 - Martínez-Rosales C, Fullana N, Musto H, Castro-Sowinski S (2012) Antarctic DNA moving forward: genomic plasticity and biotechnological potential. *FEMS Microbiol Lett*, 331:1-9.
 - Marx J-C, Collins t, D'Amico S, Feller G, Gerday C (2007) Cold-adapted enzymes from marine Antarctic microorganisms. *Mar Biotechnol*, 9: 293-304.
 - Michaux C, Massant J, Kerff F (2008) "Crystal structure of a cold-adapted class C β -lactamase," *FEBS Journal*, 275:1687-1697.
 - Morita RY (1975) Psychrophilic bacteria. *Bacteriological Reviews*, 39:144-167.
-

-
- Munier H, Gilles AM, Glaser P, Krin E, Danchin A, Sarfati RS (1991) Isolation and characterization of catalytic and calmodulin-binding domains of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase. *Eur J Biochem* 196: 469–474.
 - Nath K, Jajoo A, Poudyal RS, Timilsina R, Park YS, Aro E-M, Nam HG, Lee C-H (2013) Towards a critical understanding of the photosystem II repair mechanism and its regulation during stress conditions. *FEBS Lett*, 587(21):3372-3381.
 - Neitzel JJ (2010) Enzyme Catalysis: The Serine Proteases. *Nature Education*, 3:21.
 - Neklyudov AD, Ivankin AN, Berdutina AV (2000) Production and Purification of Protein Hydrolysates. *Appl Biochem Microbiol*, 36 317-324.
 - Nguyen TH, Ward C (1993). Stability Characterization and Formulation Development of Alteplase, a Recombinant Tissue Plasminogen Activator. *Pharm Biotechnol*, 5:91-134.
 - Nicas TI, Iglewski BH (1985) The Contribution of Exoproducts to Virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Can J Microbiol*, 31:387-92.
 - Nicodeme M, Grill JP, Humbert G, Gaillard JL (2005) Extracellular Protease Activity of Different *Pseudomonas* strains: Dependence of Proteolytic Activity on Culture Conditions. *J Appl Microbiol*, 99:641-648.
 - Obernesser HJ, Doring G, Botzenhart K (1981) Extracellular Toxins of *Pseudomonas aeruginosa*. I. Purification and Characterization of Two Exoproteases. *Zentralbl Bakteriol*, 249: 76-88.
 - Ohgiya S, Hoshino T, Okuyama H, Tanaka S, Ishizaki K (1998) Biotechnology of Enzymes From Cold-adapted Microorganisms. En: Margesin R, Schinner F (eds) *Biotechnological applications of cold adapted microorganisms*, Springer Berlin Heidelberg, 17-34.
 - Olivera-Nappa A, Reyes F, Andrews BA, Asenjo JA (2013) Cold Adaptation, Ca²⁺ Dependency and Autolytic Stability Are Related Features in a Highly Active Cold-Adapted Trypsin Resistant to Autoproteolysis Engineered for Biotechnological Applications. *PLoS ONE*, 8: e72355. doi:10.1371journal.pone.0072355.
-

-
- Parahuleva MS, Maj R, Hölschermann H, Parviz B, Abdallah Y, Erdogan A, Tillmanns H, Kanse SM (2013) Regulation of Monocyte/Macrophage Function by Factor VII Activating Protease (FSAP). *Atherosclerosis* , 2:365-372.
 - Patil U, Chaudhari A (2011) Optimal Production of Alkaline Protease from Solvent-Tolerant Alkaliphilic *Pseudomonas aeruginosa* MTCC 7926. *Indian J Biotechnol*, 10:329-339.
 - Pawar R, Zmbare V, Barve S, Paratkar G (2009) Application of Protease Isolated from *Bacillus* sp. 158 in Enzymatic Cleansing of Contact Lenses. *Biotechnol*, 8: 276-280.
 - Phan T, Ta T, Nguyen D, Van Den Broek L, Duong G (2011). Purification and Characterization of Novel Fibrinolytic Proteases as Potential Antithrombotic Agents from Earthworm *Perionyx excavates*. *AMB Express*, 1:26.
 - Petegem FV, Collins T, Meuwis MA, Gerday C, Feller G, Beeumen JV (2003) The Structure of a Cold-adapted Family 8 xylanase at 1.3 Å Resolution. Structural Adaptations to Cold and Investigation of the Active Site. *J Biol Chem*, 278(:7531–7539.
 - Pikuta EV, Hoover RB, Tang J (2007) Microbial extremophiles at the limits of life. *Crit Rev Microbiol*, 33:183-209.
 - Potvin E, Sanschagrín F, Levesque R C (2008) Sigma Factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Rev*, 32: 38–55. doi: 10.1111/j.1574-6976.2007.00092.x
 - Preetha S, Boopathy R (1994) Influence of Culture Conditions on the Production of Milk Clotting Enzyme from *Rhizomucor*. *World J Microbiol Biotechnol*, 10: 527–530.
 - Pryor KD, Leiting B (1997) High-Level Expression of Soluble Protein in *Escherichia coli* Using a His 6 -Tag and Maltose-Binding-Protein Double-Affinity Fusion System. *Protein Express Purif* 10:309-319.
 - Rani K, Rana R, Datt S (2012) Review on Latest Overview of Proteases. *IntJ Curr Life Sci*, 2:12– 18.
-

-
- Rao MB, Tanksale AM, Ghatge MS and Deshpande VV (1998) Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol Mol Biol Re*, 62: 597-635.
 - Rawlings ND, Barrett AJ (1993) Evolutionary Families of Peptidases. *Biochem J*, 290: 205-218.
 - Ray MK, Devi KU, Kumar GS, Shivaji S (1992) Extracellular Protease from the Antarctic Yeast *Candida humicola*. *Appl Environ Microbiol*, 58: 1918-1923.
 - Roberts IN, Caputo C, Criado MV, Funk C (2012) Senescence-Associated Proteases in Plants. *Physiol Plantarum*, 145: 130-139.
 - Rodrigues DF and Tiedje JM. (2008) Coping with our cold planet. *Appl Environ Microbiol*, 74:1677-1686.
 - Russell RJM, Gerike U, Danson MJ, Hough DW, Taylor GL (1998) Structural Adaptations of the Cold-active Citrate Synthase from an Antarctic Bacterium. *Structure*, 6:351-361.
 - Saba I, Qazi PH, Rather SA, Dar RA, Qadri QA, Ahmad N, Johri S, Taneja SSS (2012) Purification and Characterization of a Cold-active Alkaline Protease from *Stenotrophomonas* sp., Isolated from Kashmir, India. *World J Microbiol Biotechnol*, 28:1071-1079.
 - Satyanarayana T, Raghukumar C, Shivaji S (2005) Extremophilic Microbes: Diversity and Perspectives. *Curr Sci India*, 89: 78-90.
 - Secades P, Alvarez B, Guijarro JA (2001) Purification and Characterization of a Psychrophilic Calcium Induced, Growth-phase Dependent Metalloprotease from the Fish Pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *Appl Environ Microbiol*, 67:2436-2444.
 - Scherer RL, McIntyre JO, Matrisian LM (2008) Imaging Matrix Metalloproteinases in Cancer. *Cancer Metastasis Rev*, 27:679-90. doi: 10.1007/s10555-008-9152-9.
 - Shankar S, Mala R, Seeta Laxman R (2011). Purification and Characterization of an Alkaline Protease by a New Strain of *Beauveria* sp. *Process Biochem*, 46: 579-585.
-

-
- Sheng YX, Lin CX, Zhong XUX, Ying ZR (2011) Cold-adaptive Alkaline Protease from the Psychrophilic Planomicrobium sp. 547: Enzyme Characterization and Gene Cloning. *Adv Polar Sci*, 22:49-54.
 - Sheridan PP, Panasik N, Coombs JM & Brenchley JE (2000) Approaches for Deciphering the Structural Basis of Low Temperatures Enzyme Activity. *Biochim Biophys Acta*, 1543: 417-433.
 - Showell MS (1999) Enzymes detergent. En: Flickinger MC, Drew SW (eds) Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis and Bioseparation, vol 2. Wiley, New York, pp 958-971.
 - Sjöberg S, Shi G-P (2011) Cysteine Protease Cathepsins in Atherosclerosis and Abdominal Aortic Aneurysm. *Clin Rev Bone Miner Metab*, 9: 138–147. doi:10.1007/s12018-011-9098-2.
 - Sorensen HP, Mortensen KK (2005a) Advanced Genetic Strategies for Recombinant Protein Expression in Escherichia coli. *J Biotech*, 115:113–128.
 - Sorensen HP, Mortensen KK (2005b) Soluble Expression of Recombinant Proteins in the Cytoplasm of Escherichia coli. *Microb Cell Fact*, 4:.1
 - Sousa MJ, Ardo Y, McSweeneya PLH (2001) Advances in the Study of Proteolysis During Cheese Ripening. *Int Dairy J*, 11327–345.
 - Speed MA, Wang DIC, King J (1996) Specific Aggregation of Partially Folded Polypeptide Chains: The Molecular Basis of Inclusion Body Composition. *Nature Biotech*, 14:1283–1287.
 - Stamenkovic I (2003) Extracellular Matrix Remodelling: the Role of Matrix Metalloproteinases. *J Pathol*, 200:448-64.
 - Struvay C, Feller G (2012) Optimization to Low Temperature Activity in Psychrophilic Enzymes. *Int J Mol Sci*, 13: 11643-11665.
 - Takaiwa M, Saeki K, Okuda M, Kobayashi T, Ito S, Kubota H, Ota Y, Fujimori N (1997) Cold Alkaline Protease, Microorganism Producing the Same, Process for Producing the Same, and Detergent Compositions and Food Processing Enzyme Preparations Containing the Same. Patent N° WO9743406
-

-
- Tan GJ, Peng ZK, Lu JP, Tang FQ (2013) Cathepsins Mediate Tumor Metastasis. *World J Biol Chem*, 4: 91-101. doi:<http://dx.doi.org/10.4331/wjbc.v4.i4.91>
 - Tariq AL, Reyaz AL, Prabakaran JJ (2011) Purification and Characterization of a 56 KDa Cold Active Protease from *Serratia marcescens*. *Afr J Microbiol Res*, 5:5841-5847.
 - Thakur PB, Vaughn-Diaz VL, Greenwald JW, Gross DC (2013) ECF Sigma Factors in the Genome of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strain B728a. Table_2.xls. *PLoS ONE*. 10.1371/journal.pone.0058846.t002.
 - Thomas S, Holland IB, Schmitt L (2014) The Type 1 secretion pathway – The Hemolysin System and Beyond. *Biochim Biophys Acta*, 1843:1629-1641. doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.09.017.
 - Thomas RE, Andrews LA, Burman JL, Lin WY, Pallanck LJ (2014) PINK1-Parkin Pathway Activity Is Regulated by Degradation of PINK1 in the Mitochondrial Matrix. *PLoS Genet*, 10: e1004279. doi:10.1371/journal.pgen.1004279.
 - Turkiewicz M, Pazgier M, Kalinowska H, Bielecki SA (2003) A Cold Adapted Extracellular Serine Protease of the Yeast *Leucosporidium antarcticum*. *Extremophiles*, 7:435-442.
 - Van den Burg B (2003) Extremophiles as a Source for Novel Enzymes. *Curr Opin Microbiol*, 6:213-218.
 - Vassar R, Kuhn P-H, Haass C, Kennedy ME, Rajendran L, Wong PC, Lichtenthaler SF (2014) Function, Therapeutic Potential and Cell Biology of BACE Proteases: Current Status and Future Prospects. *J Neurochem*, 130:4-28. doi: 10.1111/jnc.12715.
 - Vazquez SC, Coria SH, Mac Cormack WP(2004) Extracellular Proteases from Eight Psychrotolerant Antarctic Strains. *Microbiol Res*, 159:157-166.
 - Veessenmeyer JL, Hauser AR, Lisboa T, Rello J (2009) *Pseudomonas aeruginosa* Virulence and Therapy: Evolving Translational Strategies. *Crit Care Med*, 37:1777-86. doi: 10.1097/CCM.0b013e31819ff137.
-

-
- Villeret V, Chessa J P, Gerday C, Van Beeumen J (1997) Preliminary Crystal Structure Determination of the Alkaline Protease from Antarctic psychrophile *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein Sci.* 6:2462-2467.
 - Violot S, Aghajari N, Czjzek M, Feller G, Sonan GK, Gouet P, Gerday C, Haser R, Receveur-Bréchet V. (2005). Structure of a Full Length Psychrophilic Cellulase from *Pseudoaltermonas haloplanktis* revealed by X-ray Diffraction and Small Angle X-ray Scattering. *J Mol Biol*, 348: 1211–1224, doi:10.1016/j.jmb.2005.03.026.
 - Wang E, Koutsioulis D, Leiros HKS (2007) “Crystal Structure of Alkaline Phosphatase from the Antarctic Bacterium TAB5,” *J Mol Biol*, 366:1318–1331.
 - Wang F, Hao J, Yang C, Sun M (2010) Cloning, Expression and Identification of a Novel Extracellular Cold-adapted Alkaline Protease Gene of Marine Bacterium Strain YS-80-122. *Appl Biochem Biotechnol*, 162: 1497-1505
 - Walasek P, Honek JF (2005) Nonnatural Amino Acid Incorporation into the Methionine 214 Position of the Metzincin *Pseudomonas aeruginosa* Alkaline protease. *BMC Biochem*, 6:21. doi:10.1186/1471-2091-6-21
 - Wang Q, Miao JL, Hou YH, Ding Y, Wang GD, Li GY (2005) Purification and Characterization of an Extracellular Cold-active Serine Protease from the Psychrophilic Bacterium *Colwellia* sp. NJ341. *Biotech Lett*, 27:1195-1198.
 - Woods RG, Burger M, Beven C-A, Beacham IR (2001) The aprX-lipA Operon of *Pseudomonas fluorescens* B52: a Molecular Analysis of Metalloprotease and Lipase Production. *Microbiology* 147: 345–354.
 - Xiong H, Song L, Xu Y (2007) Characterization of Proteolytic Bacteria from the Aleutian Aeepsea and Their proteases. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 34:63-17.
 - Xu GY, Cui SS, Lin XZ (2011) Cloning and Heterologous Expression of Pro-2127, a Gene Encoding Cold-active Protease from *Pseudoalteromonas* sp. QI-1. *Adv Polar Sci*, 2:124–130.
 - Yang C, Wang F, Hao J, Zhang K, Yuan N, Sun M (2010) Identification of a Proteolytic Bacterium HW08 and Characterization of its Extracellular Cold-
-

-
- active Alkaline Metalloprotease ps5. *Biosci Biotechnol Biochem*, 74:1220-1225.
- Yen MR, Peabody CR, Partovi SM, Zhai Y, Tseng YH, Saier Jr. M (2002) Protein-translocating Outer Membrane Porins of Gram-negative Bacteria. *Biochim Biophys Acta*, 1562:6-31.
 - Zhang S-C, Sun M, Li T, Wang Q-H, Hao J-H, et al. (2011) Structure Analysis of a New Psychrophilic Marine Protease. *PLoS ONE*, 6: e26939. doi:10.1371/journal.pone.0026939.
 - Zhang L, Conway JF, Thibodeau PH (2012) Calcium-induced Folding and Stabilization of the *Pseudomonas aeruginosa* Alkaline Protease. *J Biol Chem*, 287:4311-4322
 - Zhong C, Song S, Fang N, Liang X, Zhu H, Tang X-F, Tanf B (2009) Improvement of Low-Temperature Caseinolytic Activity of a Thermophilic Subtilase by Directed Evolution and Site-Directed Mutagenesis. *Biotechnol Bioeng*, 104:862-870
 - Zhu HY, Tian Y, Hou YH, Wang TH (2009) Purification and Characterization of the Cold-active Alkaline Protease from Marine Cold-adaptive *Penicillium chrysogenum* FS010. *Mol Biol Rep*, 36:2169-2174.
 - Yan BQ, Chen XL, Hou XY, He HL, Zhou BC, Zhang YZ (2009)+. Molecular analysis of the gene encoding a cold-adapted halophilic subtilase from deep-sea psychrotolerant bacterium *Pseudoalteromonas* sp. SM9913: cloning, expression, characterization and function analysis of the C-terminal PPC domains. *Extremophiles*, 13: 725-733.
-

Anexo I – Medios de cultivo

Medio LB	
Triptona	10 g/L
Extracto de levadura	5 g/L

Medio ML	
Medio LB diluido 1/10	500 mL
Leche descremada al 10%	500 mL
El medio LB 1/10 se prepara y se esteriliza. Por separado se prepara 500 mL de leche descremada 10% y se esteriliza por autoclave durante 8 min. Finalmente se mezclan ambas preparaciones.	

Medio PFm	
Triptona	20 g/L
MgSO ₄	1,5 g/L
K ₂ HPO ₄	1,5 g/L
Glicerol	8,7 %

Anexo II - Composición de geles de electroforesis de proteínas

Geles para SDS-PAGE			
Gel separador 12% (5 mL)		Gel concentrador 5 % (2mL)	
Tampón Tris 1,5 M pH 8,8	1,6	Tampón Tris 1,0 M pH 6,8	0,25
mL		mL	
SDS 10 %	1,3 mL	SDS 10 %	0,02 mL
Mix acrilamida 30%	2,0 mL	Mix acrilamida 30%	0,33 mL
TEMED	0,002 mL	TEMED	0,002 mL
PSA 10%	0,05 mL	PSA 10%	0,02 mL
H ₂ O mQ	1,6 mL	H ₂ O mQ	1,4 mL

Geles de actividad			
Gel concentrador 5%		Gel separador 8 %	
Tampón Tris 1,0 M pH 6,8	1,6	Tampón Tris 1,5 M pH 8,8	2.5
mL		mL	
Gelatina	0.003 g	Gelatina	0.005 mL
Mix acrilamida 30%	2,0 mL	Mix acrilamida 30%	2,7 mL
TEMED	0,004 mL	TEMED	0,006 mL
PSA 10%	0,04 mL	PSA 10%	0,1 mL
H ₂ O mQ	2.7mL	H ₂ O mQ	4,6 mL

PSA – Persulfato de amonio

Anexo III – Buffers y soluciones

Tampón de corrida 10X SDS-PAGE		Tampón de corrida 5X PAGE NATIVA	
Tris Base	30.2 g/L	Tris Base	15.1 g/L
Glicina	144 g/L	Glicina	94 g/L
SDS	10 g/L		

Solución colorante Coomassie		Solución decolorante	
Coomassie Brilliant Blue R-250	1g	Ácido acético glacial	100 mL
Ácido acético glacial	100 mL	Etanol 95%	400 mL
Etanol	400 mL	H ₂ O	mQ csp 500 mL
H ₂ O mQ	csp 500 mL		

Tampón de transferencia TOWBIN		Tampón de lavado para Western blot	
Tris Base	25 mM	Tampón PBS 1X	
Glicina	192 mM	0.1% Tween 20	
Metano	10%		

Tampón de plegamiento pH 7		Tampón de lavado IMAC	
Tris Base	50 mM	Tris Base	50 mM
NaCl	150 mM	NaCl	150 mM
CaCl ₂	100µM	CaCl ₂	100µM
		Imidazol	30 mM

Tampón de elución IMAC		Tampón TAE 50X	
Tris Base	50 mM	Tris Base	24.2 g

NaCl	150 mM	Ácido acético	5.71 mL
CaCl ₂	100µM	EDTA 0.5M, pH8	10 mL
Imidazol	400 mM	H ₂ O mQ	csp 100 mL

Tampón de actividad enzimática	Tampón de almacenamiento de MP10
50 mM Tris-HCl, pH 8	Tris 20 mM
	CaCl ₂ 1 mM
	pH8

Tampón de lisis pH 7	
Tris Base	50 mM
NaCl	150 mM

Tampón de muestra SDS-PAGE		Tampón de muestra 2X para PAGE nativa	
Tris Base	1.52 g	Tris 0.5 M, pH 6.8	1mL
SDS	2 g	Glicerol	0.8 mL
Azul de bromofenol	1 mg	Azul de bromofenol	4 mg
B-mercaptoetanol	2 mL	H ₂ O mQ	4 mL
Glicerol	20 mL		
H ₂ O mQ csp	50 mL		

Anexo IV – Secuencia nucleotídica reconstruida

En color rojo se destaca la secuencia codificante de MP10. Sobre la misma se indica en negro las regiones en donde hibridan los cebadores específicos E23 y E422 y los cebadores de iPCR E23out y E422out. En color fucsia se muestra la secuencia codificante del inhibidor de MP10 y en color azul parte de la secuencia codificante de la proteína ABC componente del sistema de secreción.

5´ GGGGTATCTTTCTTTTGTCCCCGCGGCCAGTGGGGGGCTTTCATTGGGTTTAAAAGCTGGTTAACACA
 CTTGAAGGGCCAAGGACCGCGGGGAATGTGGGGGCTTCCCGGTTCCCAATTCTAACGGGCCCTGCTTCTTGC
 GTTTTTGAGGCCCGTGTTCCCCATCCCCTTGTGGGATTTCTCTTCAAAGGTGGGCTTGGGGTGTGCCACGC
 GGGGGCGGTTCTTTATCCGCTGGCCCCCTGAAAGAACTCCCCACAAAAACGCGTTGGGCGGGGGAGCGG
 GTTTTCCCAACGATTGGCCCCATTTAGCCCCAGCCTTTTGCCAAAACCGCGGAGATGTTCCAGCCCCTTGCAAGC
 CCCAGGAGCTGCGGGTCGATGGTTACCCAGTGGGCCGCCATTTGATGGAGATTCTTCACCCTTTTTCCGAGGCGG
 TACGCCGGGCATGGGCTCGATTGTGGTGATCATCGCCACCCGACGCACCCGTTTTGCCGCACCAGTGCCAGCGCC
 TGGCGCAGCGCGCCGCAATTGGCCATTCGCGCACGGGTGGCGGCACCGAGGATTCCAGCGGCGATCTGTTCCCTGG
 CGTTCCCCCCCCGGCAACCAGAACCTGCCACCGGCGGATTACGGGCGCAAAGGCTTGCCGTTGAGCACCGCGTTG
 CCAGATGGTCAATAACGACCCATATTTGCGCGCTGTTACGCGCGGCGGCGGAGGCGGTGGAGGAGGCGATCATCA
 ACCGCCATACTGGCCGGCGAGGCCATGAGCACCGACGAAGGCGTCAAGGTGCCGGGGCTTGCAGCGAGACATTA
 TTAGCGGCATTACACAAGAGCGGCTGGAGTGTGGCCGGTAATAGGGGACAACATTAATTAATAGTCTAAGTAGT
 GGCTCTTTAATGTTGCCAATGACACCGTGACAATATAGTGGATCCACTATTTAAGTGGGCGGCTCAATTAGAGCG
 GCTTTACCTGTATTTAATATTTAAATAACACCCAGTGCGCCGCCGATGGGCAAAAGCAATTGCCCCCAATAAACA
 CTGCCCGGGTCTTCCTTAAGTTGAATCTGTGTACATTTTCGCTGCGGAAATATGTGTAGACGAAAGATTTCAAG
 TTGTGTGAGTTTCGATACGCCTTCAAAGAGGTGAGTGATGGGACGATCTCGTCCGCGAGGTTCTATCGACCAA
 AGACTGATGCACTTGCAAACAAGGAAGTACGTTT **ATG**TCAAAAGTAAAAGACAAAGCTATCGTGTCTGCCGCGCA
AGCCAGCACTGCTTACTCGCAAATCGATAGTTTTAGCCATCAGTATGACCGTGGCGGCAACCTCACGGTGAATGG
CAAACCCTCCTTTACCGTGGACCAGGCAGCGGACCACCTGCTGCGCGATGGCGCCGCTTACAAGGACGTGAACCA
CAACGGCAAGATTGACCTGACCTACACCTTCTCGCTCGGCCAGCTCGGCGACCATGAACAAGCATGGCATCTC
CGGGTTACGCCAGTTCAACACCCAGCAGAAAGCACAGGCCGTATTGGCCATGCAATCCTGGGCGGATGTCGCCAA
 CGTGAGCTTTACCGAAAGCGCCTCGGGCGGTGACACACACATGACCTTCGGCAACTACAGCGGCGGCCAGGCCGG
 CGCTGCAGCCTTCGCTTACCTGCCCGCACCGGCGCAGGCTACGACGGCACGTCGTGGTACCTGACCAACAGCAG
 CTACACGCCGAACAAGGCTCCGGACCTGAACAACATATGGCCGGCAGACCCTGACCCACGAAATCGGCCACACCCT
 GGGCCTGGCGCACCTGGCGACTACAACGCCGGGACCGGCAACCCGACCTACAAAAACGCGGACTATGGACAGGA
 CACGCGCG**GCTACAGCGTCATGAGTTACT**GGAGCGAGAGCAATACCAACCAGAACTTCACCAAAGCGGCGTTCGA
 AGCTTACGCCTCAGGCCCCTGATCGACGACATCGCCGCGATCCAGAAGCTCTACGGTGCCAACTACAACACCCG
 CGCCGGTGACACCACTTACGGGTTCAACTCCAACACCGGGCGTGATTTCTACAGCGCCACATCCAATGCCGACAA
 GCTGGTGTCTCGGTATGGGACGGTGGCGGCAACGACACCCTGGACTTCTCCGGTTTTACCCAGAACCAGAAGAT
 CAACCTCAATGAGGCCTCGTTCTCCGACGTTGGCGGCTGGTGGGCAACGTGTCCATCGCCAAGGGCGTCACCGT
 CGAGAACCGGTTCCGGTGGTTCGGGCAACGACCTGATCATTTGGTAACAACGCAGCCAACCTCATCAAAGGCGGTGC
 CGGCAACGACATCATCTACGGCGGTGGCGGTGCGGACCAGCTGTGGGGCGGCGCCGGCAATGACACCTTCGTGTT
 CGGTGCCAGCTCCGACTCCAAGCCTGGTGTGCCGACAAGATCTTTGACTTCACCTCGGGTTCGGACAAGATCGA
 CCTGTCCGGCATCACCAAAGGTGCAGGCTTGACCTTCGTCAACGCGTTACCCGGCCACGCCGGCGACGCTGTGCT
 GAGCTATGCCTCGGGTACTAACCTGGGCACCTTGCCCGTGGACTTCTCCGGGACGGCATGGCGGATTTCTCGT
 CACCACCGTTGGCCAGGCAGTTGCCAGCGACATCGTAGCG**TGA**ATGTAAAAGCGCGCGGCGCTCCGGCGCCGCG
 CTCTAGGATGGAGCAGAAA **ATG**CCGCGTTTTTCTCATTTGATCGCCTGTGCTTCGCAGGTGTTGTTTCGTGTCGGC

AGGAGCCCATGCAATGGCTAGCAGTCTTGTTTTACCCACCACCGCCCAGTTGGCCGGCCACTGGCAGTTGCACCA
GCAGGATCAGGTGTGCGCGCTGGACCTGTTGGACCAGCCGAACGCGCTGGCCGGTGTATGTCGTCTGTGCTGAACA
ATGGCTGGGGGATAAACCCCTGACTTGTTGCCGACCCCGGACGGCATCTGGCTGATGAATGCCCAAGGCACCGG
CATTATCCATTTAAATCGTGAAAAAGACGGTGAATATAAAGGCCACACGGCGTCGATACCCGGAAGTTGTGCTGC
AACGAACACCTTAAATTAAAAAGTTATAAGCATATAACTCGATTTTAATAGTTGGCCGCCCTTGTCAGGGTTCGGG
CAACTGTTGTGCGTAATTTGCTTCAGGGAAGATCAGAAGATATGGCGAAGTCCCATGCGGTTGCGCCCTTATTCA
GGGCGTTGGGTGAATACAAGAGTATTTTGATCAGTATCGGCTTTTTCACCGCATTGATTAACCTGTTGATGCTGG
TGCCGTCGATTTACATGCTGCAAGTGTATGACCGTGTGTTGTCTCCAGAAATGAAACCACCCTGGGTGATGTTG
ACGCTGAAGGTCGTGGGCTTCTTCCCGTTTATCGGCACGCTGGAAGTCATTCCCAGTTTTATCGGGATCCGCATC
GGCAGCCACTTGGAGCGGCGTTTACATTTGGCGGCTTCAAAGCCCGGTTTAAACGCACCTGCAACTTGGCCAGA
AACACCCGGGGAACCCTGGGGGAACCTCCCCGAATCCGCAATTTATCACGGGACGCGGCGGTTCCCGTTTTTTTA
AGCGCGGGGTTCCCCCACCCGGTTGGGAATTTTCTCTCACGGGGGCTCGGCCGCTGGACCAGCGGGGG 3'
