



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escuela Técnica Superior
de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural
(EAMN)

**Optimizando la purificación de ornitina transcarbamilasa
humana (OTC) producida recombinantemente**

TRABAJO FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

Curso: 2018/2019

Valencia, Septiembre de 2019

Autora: Widad Mâmmmer Bouhou

Tutores experimentales: Vicente Rubio Zamora y Clara Marco Marín

Tutora académica: Lynne Paula Yenush

Optimizando la purificación de Ornitina transcarbamilasa humana (OTC) producida recombinantemente

Resumen: La ornitina transcarbamilasa (OTC) es un enzima mitocondrial que cataliza el segundo paso del ciclo de la urea. Este ciclo incorpora el amonio derivado del catabolismo proteico, que es altamente tóxico, en urea, molécula inocua que se elimina en la orina. Mutaciones en el gen para OTC causan la deficiencia de OTC (OTCD), el único error del ciclo de la urea ligado al cromosoma X y el más frecuente de dicho ciclo. Para corroborar el potencial de una mutación de causar la enfermedad es importante estudiar experimentalmente las consecuencias de introducir la mutación en la proteína, principalmente sobre su estabilidad, su actividad y sus parámetros cinéticos. Por eso es conveniente disponer de métodos para producir OTC humana recombinante pura que permitan la mutagénesis dirigida de la enzima. Además, muchas mutaciones de cambio de sentido producen formas de OTC mutantes que son inestables y que podrían ser estabilizadas por farmacochaperonas por descubrir. El descubrimiento de estas moléculas requiere de enzima puro mutante en el que pueda probarse el poder estabilizador de compuestos candidatos. Disponer de enzima pura es también importante para la realización de estudios de su enzimología básica (mecanismo, reguladores, cambios conformacionales, etc) así como para medir mediante acoplamiento con OTC la producción de carbamil fosfato como citrulina, como en los ensayos de carbamil fosfato sintetasa (el enzima que cataliza el primer paso del ciclo de la urea). La producción recombinante de OTC humana se hacía hasta ahora utilizando un sistema de expresión en *Escherichia coli* en el que la forma madura de la OTC humana se coexpresaba con chaperonas bacterianas sobreexpresadas, para favorecer su correcto plegamiento y solubilidad. Sin embargo, el procedimiento de purificación empleado era laborioso, ya que la OTC se producía sin etiqueta alguna que hiciera posible la purificación fácil por cromatografía de afinidad. Aquí hemos planteado producir la OTC con etiquetas de polihistidinas que faciliten su purificación por cromatografía de afinidad a níquel. Para fusionar la etiqueta en los extremos N- o C-terminal de la OTC hemos usado dos vectores de expresión: pLIC-SGC1 para ubicación N-terminal, y pOPINE para añadirla en C-terminal, procediendo luego a la expresión en *E. coli* a partir de uno u otro de dichos plásmidos y a la purificación y estudio de las dos formas enzimáticas etiquetadas. Describimos aquí dichas purificaciones y el ensayo de las actividades enzimáticas de ambas formas etiquetadas, comprobando que ambas presentan una actividad considerablemente inferior a la de la enzima purificada en paralelo sin etiqueta. También hemos corroborado mediante un proceso de escisión de la etiqueta N-terminal de la proteína, seguido de purificación piloto rápida de la enzima, que es realmente la presencia de la etiqueta la causa de la baja actividad de nuestras formas recombinantes, ya que tanto en actividad como en parámetros cinéticos la forma desposeída de etiqueta se comportó del mismo modo que la forma que nunca fue etiquetada. Estos estudios servirán de base para el establecimiento de un procedimiento preparativo de obtención fácil de OTC recombinante humana, silvestre o mutante.

Palabras clave: Ornitina transcarbamilasa (OTC), deficiencia de OTC, errores del ciclo de la urea (UCDs), etiqueta de polihistidinas, producción de OTC, purificación de OTC.

Alumna: Dña. Widad Mâmmer Bouhou

Tutores: Dr. Vicente Rubio Zamora, Dra. Clara Marco Marín

Tutora académica: Prof. Dña. Lynne Paula Yenush

Valencia, Septiembre de 2019

Optimizing recombinant purification of recombinantly produced human ornithine transcarbamylase (OTC)

Abstract: Ornithine transcarbamylase (OTC) is a mitochondrial enzyme that catalyzes the second step of the urea cycle. This cycle incorporates the ammonium derived from protein catabolism, which is highly toxic, in urea, a harmless molecule that is eliminated in the urine. OTC gene mutations cause OTC deficiency (OTCD), the only urea cycle error linked to the X chromosome and the most frequent of that cycle. To corroborate the potential of a mutation to cause disease it is important to study experimentally the consequences of introducing the mutation into the protein, mainly on its stability, its activity and its kinetic parameters. That is why it is convenient to have methods to produce pure recombinant human OTC that allow directed mutagenesis of the enzyme. In addition, many sense change mutations produce mutant OTC forms that are unstable and could be stabilized by pharmacochaperones to be discovered. The discovery of these molecules requires a pure mutant enzyme in which the stabilizing power of candidate compounds can be tested. Having a pure enzyme is also important for carrying out studies of its basic enzymology (mechanism, regulators, conformational changes, etc.) as well as for measuring the production of carbamyl phosphate as citrulline by OTC coupling, as in the carbamyl phosphate synthetase assays. (the enzyme that catalyzes the first step of the urea cycle). The recombinant production of human OTC was done until now using an expression system in *Escherichia coli* in which the mature form of human OTC was coexpressed with overexpressed bacterial chaperones, to favor its correct folding and solubility. However, the purification procedure used was laborious, since OTC was produced without any label that made it easy to purify by affinity chromatography. Here we have proposed to produce OTC with polyhistidine labels that facilitate its purification by nickel affinity chromatography. To merge the label at the N- or C-terminal ends of the OTC we have used two expression vectors: pLIC-SGC1 for N-terminal location, and pOPINE to add it at C-terminal, then proceed to *E. coli* expression from one or the other of said plasmids and to the purification and study of the two labeled enzymatic forms. We describe here these purifications and the test of the enzymatic activities of both labeled forms, verifying that both present an activity considerably lower than that of the purified enzyme in parallel without labeling. We have also corroborated by a process of cleavage of the N-terminal tag of the protein, followed by rapid pilot purification of the enzyme, which is really the presence of the tag the cause of the low activity of our recombinant forms, since both in activity as in kinetic parameters the dispossessed form of label behaved in the same way as the form that was never labeled. These studies will serve as a basis for the establishment of a preparatory procedure for obtaining easy recombinant human, wild or mutant OTC.

Keywords: Ornithine transcarbamylase (OTC), OTC deficiency, urea cycle disorders (UCDs), polyhistidine tag, OTC production, OTC purification.

AGRADECIMIENTOS

Voy a aprovechar este apartado no solo para agradecer el apoyo de la gente que me ha acompañado estos últimos meses de TFG, sino a toda la gente con la que he compartido momentos agradables durante toda la carrera.

En primer lugar, agradecer a Vicente Rubio por haberme dado la oportunidad de realizar este TFG en su laboratorio, por haberme hecho crecer y madurar tanto profesional como personalmente. Agradecer a todos mis compañeros de la Unidad de Enzimopatología Estructural del Ibv; a Alicia, María Pilar, Belén, Nadine y Clara, por toda la ayuda que me han proporcionado.

Mención especial a Clara, por toda la confianza que me has transmitido desde el primer día que pisé el Ibv, por todas las explicaciones que me has dado y por lo bien que lo haces. Muchas gracias por enseñarme que a pesar de que las cosas no salgan bien, siempre se aprende de ellas.

Otra mención súper especial a Nadine por ser la “Supermami” del laboratorio, por ayudarme tanto en este trabajo, por resolverme cualquier duda que tenía, por arreglarme siempre la sonda del sonicador y sacarme el rotor de la centrífuga, pero sobre todo por aguantarme durante la época de los “ensayos de actividad”. Muchas gracias, Nadine.

Agradecer también a Ada por estar siempre ahí, por animarme siempre que veía todo de color negro y por aconsejarme y enseñarme cómo afrontar cualquier obstáculo que me encontraba.

A Badr y Ramón, gracias por hacer de los ratos del laboratorio mucho más amenos, gracias por todas las risas, por las comidas en el rectorado, por hacer mucho más divertida esta recta final de TFG y sobre todo, por tomarnos todo con sentido del humor. Os he cogido mucho cariño.

A todos mis compañerxs y amigxs por estos cuatro años de carrera, Laura Sánchez, Mar, Teresa, Carmen Sanz, Gemma, Andrea y Sergio, etc, y especialmente a Laura, Mar, Gemma y Sergio por apoyarme y estar ahí estas últimas semanas.

Por último y no menos importante, agradecer a mi familia por el apoyo incondicional, por estar siempre pendiente de todo y por liberarme de cualquier tarea en casa por “estar con el TFG”. Gracias, os quiero mucho, a Ayman también, aunque eres muy pesado.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. El ciclo de la urea y sus enfermedades	1
1.2. Deficiencia de OTC (OTCD)	2
1.3. Ornitina transcarbamilasa humana (OTC)	3
1.4. ¿Por qué interesa producir la OTC humana recombinante pura?	4
1.5. Métodos de purificación de OTC humana recombinante	5
2. OBJETIVOS	7
3. MATERIALES Y MÉTODOS	8
3.1. Obtención del DNA molde	8
3.2. Clonación en pLIC-SGC1	8
3.2.1 Extracción y linealización del vector pLIC- SGC1.....	8
3.2.2. Tratamiento del vector PLIC-SGC1 linealizado con T4 polimerasa	9
3.2.3. Preparación de inserto	9
3.2.3. Ligación.....	11
3.2.4. Transformación	11
3.2.5. Selección de transformantes y secuenciación	11
3.3 Clonación en pOPINE	12
3.3.1. Diseño y preparación de cebadores.....	13
3.3.2. Preparación del inserto	13
3.3.3Reacción In-fusion	13
3.3.4.Transformación	14
3.3.5.Selección de transformantes y secuenciación	14
3.4. Transformación de las construcciones en <i>E. coli</i> BL21	14
3.5. Prueba de expresión y solubilidad de OTC recombinante	15
3.6. Purificación de OTC recombinante	16
3.6.1. Purificación de OTC recombinante sin etiqueta	16
3.6.2. Purificación de OTC recombinante con etiqueta His ₆	17
3.7. Ensayos de actividad y parámetros cinéticos.....	18
3.7.1. Ensayo estándar de actividad enzimática	18
3.7.2. Ensayos de parámetros cinéticos de ornitina y carbamil fosfato	18
3.8. Otros métodos.....	18

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	19
4.1. Clonaciones.....	19
4.1.1. Clonación en pLIC-SGC1	20
4.1.2. Clonación en pOPINE.....	23
4.2. Producción de OTC con etiquetas His ₆	25
4.2.1. Producción de His ₆ -OTC	25
4.2.2. Producción de OTC-His ₆	27
4.3. Purificación de OTC recombinante	28
4.3.1. Purificación de OTC sin etiqueta	28
4.3.2. Purificación de His ₆ -OTC y OTC-His ₆ en un solo paso de afinidad a Ni ²⁺	30
4.4. Ensayos de actividad.....	32
4.5. La digestión de His ₆ N-terminal con proteasa TEV recupera la actividad plena de la OTC	33
4.6. Prueba piloto de purificación rápida de His ₆ -OTC y digestión con TEV.....	34
4.7. La cinética de la forma de OTC aislada en el ensayo piloto de escisión de etiqueta con TEV es indiferenciable respecto a la de la OTC producida inicialmente sin etiqueta	35
5. CONSIDERACIONES FINALES.....	36
6. BIBLIOGRAFÍA.....	37

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema del ciclo de la urea.....	1
Figura 2. Reacción catalizada por la OTC humana.	3
Figura 3. Estructura tridimensional de la OTC humana.	4
Figura 4. Esquema de la construcción pLIC-HuOTC.	12
Figura 5. Esquema de la construcción pOPINE-HuOTC.....	14
Figura 6. Esquema general de las dos estrategias seguidas para la producción de His ₆ -OTC y OTC-His ₆	19
Figura 7. Esquema general de la clonación en pLIC-SGC1.....	20
Figura 8. Análisis electroforético de la amplificación y digestión de pLIC-SGC1.	21
Figura 9. Extremos del inserto (OTC) y el vector (pLIC-SGC1) antes y tras su tratamiento con T4 polimerasa.....	22
Figura 10. Esquema de la preparación de la PCR a partir de colonias y precultivos para realizar la extracción de los plásmidos transformados.	23
Figura 11. Análisis electroforético de la PCR para selección de transformantes de pLIC-HuOTC..	23
Figura 12. Esquema general de la clonación en pOPINE.	24
Figura 13. Análisis electroforético de la amplificación del gen OTC para clonación en pOPINE. 25	25
Figura 14. Análisis electroforético de la PCR a partir de colonias para selección de transformantes de pOPINE-HuOTC.....	25
Figura 15. Análisis de la expresión y solubilidad de la OTC humana en cultivos de BL21 con pET22b-HuOTC + pGroEL/ES, pLIC-HuOTC y pLIC-HuOTC + pGroEL/ES.	26
Figura 16. Esquema general del procedimiento de expresión de His ₆ -OTC y OTC-His ₆	27
Figura 17. Análisis de la expresión y solubilidad de la OTC humana en cultivos de BL21 con pOPINE-HuOTC y pOPINE-HuOTC + pGroEL/ES.....	27
Figura 18. Comprobación de la sobreexpresión de OTC en BL21.	28
Figura 19. Esquema de las etapas de la purificación de la OTC sin etiqueta His ₆	29
Figura 20. Análisis electroforético en un gel SDS-PAGE al 12% del sobrenadante y precipitado de las distintas etapas de la purificación de la OTC carente de etiqueta.	29
Figura 21. Cromatograma de purificación de la OTC humana recombinante sin etiqueta producida a partir de pET22-HuOTC con columna de intercambio iónico..	30
Figura 22. Cromatograma correspondiente a la purificación de His ₆ -OTC con columna de níquel..	30

Figura 23. Cromatograma correspondiente a la purificación de OTC-His6 con columna de níquel..	31
Figura 24. Análisis electroforético SDS-PAGE de la pureza y del rendimiento de las formas de OTC producidas sin etiqueta de His ₆ N-terminal o C-terminal.....	32
Figura 25. Actividad de las formas de OTC sin etiqueta o con etiqueta N- o C-terminal.	33
Figura 26. Análisis de la eficacia de digestión con proteasa TEV y valores de actividad específica (U/mg).....	33
Figura 27. Análisis electroforético de las muestras de OTC con etiqueta amino-terminal purificada con columna His Spi-Trap antes y tras su digestión con proteasa TEV etiquetada con poli-His.	34
Figura 28. Dependencia de la actividad respecto a la concentración de los sustratos..	35

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Oligonucleótidos empleados y sus correspondientes temperaturas predichas de fusión (Tm (° C)).	8
Tabla 2. Preparación de la mezcla de reacción utilizada para la PCR.....	10
Tabla 3. Mezcla de reacción utilizada para la PCR a partir de colonia.....	12

ABREVIATURAS

ARG1: Arginasa

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

ASL: Arginatosuccinato liasa

ASS: Arginosuccinato sintetasa

BSA: Albúmina de suero bovino

CP: Carbamilfosfato

CPS1: Carbamil fosfato sintetasa

DMSO: Dimetilsulfóxido

DTT: ditioneol

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

FPLC: Fast Protein Liquid Chromatography

HuOTC: Ornitina transcarbamilasa humana

IPTG: isopropil- β - D- tiogalactósido

LB: Luria-Bertani

MSH: B-mercaptoetanol

NAGS: N-Acetilglutamato sintetasa

OTC: Ornitina transcarbamilasa

OTCD: Deficiencia de Ornitina transcarbamilasa

PALO: N-fosfanoacetil-L-ornitina

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico

Tris: Tris(hidroximetil)aminometano

UCDs: Errores del ciclo de la urea

dCTP: Desoxiguanidina trifosfato

dGTP: Desoxicitidina trifosfato

kDa: Kilodaltons

kb: Kilobases

pb: Pares de bases

1.INTRODUCCIÓN

1.1.El ciclo de la urea y sus enfermedades

La excreción del amonio, un compuesto derivado del catabolismo de proteínas, es de vital importancia en los seres vivos, pues es neurotóxico cuando su nivel es alto (Häberle y Rubio, 2014). El ciclo de la urea evita en seres humanos esta toxicidad mediante la conversión del amonio a urea, mucho menos tóxica y excretable en la orina en forma concentrada. Esta conversión tiene lugar por la vía metabólica cíclica conocida como ciclo de la urea, compartimentada entre mitocondria y citosol (Gamble y Lehninger 1973), que se lleva a cabo exclusivamente en el hígado, concretamente en los hepatocitos periportales (Häberle et al., 2019). Catalizan sus reacciones cinco enzimas nucleares (Fig. 1) más uno activador (acetilglutamato sintasa) de la carbamil fosfato sintetasa 1 (CPS1). Estos dos últimos enzimas, más la ornitina transcarbamilasa (OTC; objeto de este trabajo) componen la parte intramitocondrial del ciclo, mientras que argininosuccinato sintetasa (ASS), liasa (ASL) y arginasa 1 (ARG1) son citosólicos (Gamble y Lehninger; Häberle and Rubio 2014). Un aminoácido no proteico, la ornitina, desempeña un papel catalítico en el ciclo, ya que sobre su esqueleto se incorporan los elementos de la urea, regenerándose la ornitina al final de cada vuelta del ciclo, cuando se libera dicha urea (Fig. 1). Así, a partir de la ornitina se produce citrulina dentro de la mitocondria, debiendo ser exportada al citosol en intercambio por ornitina, reacción de intercambio que cataliza un antiportador dedicado, ORNT1 (Indiveri et al. 1997).

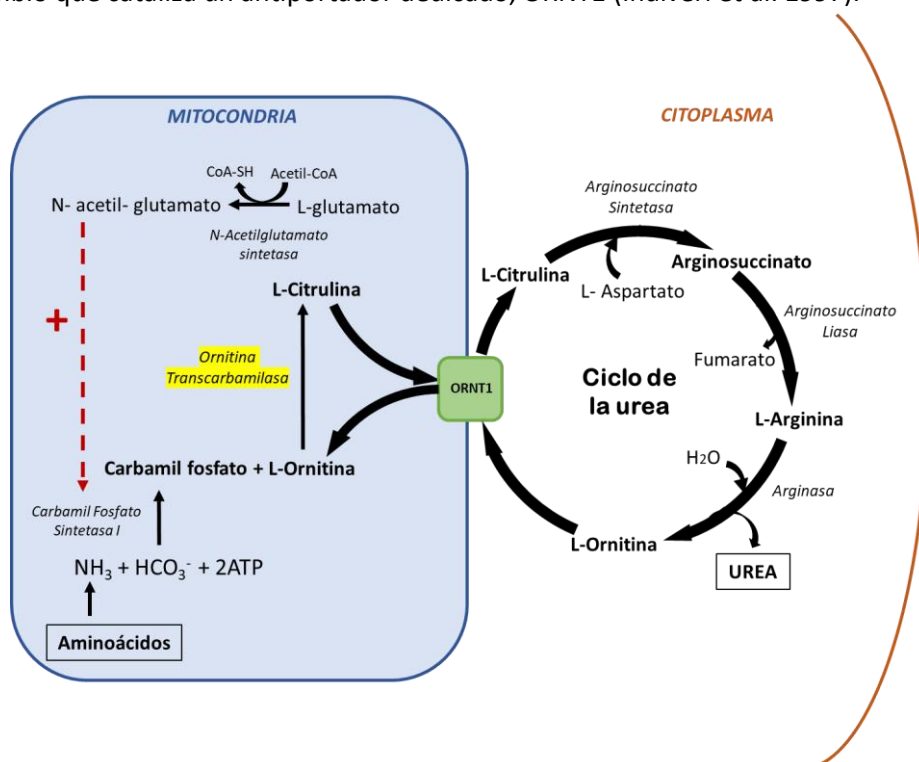


Figura 1. Esquema del ciclo de la urea. El antiportador de ornitina/citrulina (ORNT1) se representa en forma de un cuadro verde claro. La flecha discontinua granate hace referencia a la activación de la CPS1 por parte del NAG. En amarillo se resalta el enzima con el que se ha trabajado en este proyecto, la OTC.

Un fallo en cualquiera de los enzimas o el transportador mencionados puede producir hiperamonemia, con graves consecuencias clínicas que pueden llevar al coma y a la muerte en los pacientes (Häberle y Rubio, 2016). Las enfermedades resultantes de estos fallos se conocen como errores del ciclo de la urea (UCDs, por las siglas en inglés correspondientes a “urea cycle disorders”), todas ellas enfermedades autosómicas recesivas excepto la más prevalente, la deficiencia de la enzima OTC (Lichter-Konecki et al. 2013), que está ligada al cromosoma X.

1.2. Deficiencia de OTC (OTCD)

Por estar ligada al cromosoma X, esta deficiencia (OTCD; OMIM #311250) es el error congénito observado más frecuentemente entre los del ciclo de la urea, por manifestarlo todos los varones hemizigotos portadores del defecto en el gen de la OTC, más algunas hembras portadoras si el fenómeno de Lyonización resulta desfavorable en su hígado. Así, se ha estimado su prevalencia en 1/ 66000- 72000 (Summar et al., 2013). El efecto de este déficit es una hiperamonemia pura, consecuencia de la acumulación de carbamil fosfato al no ser utilizado por la OTC. Este compuesto acumulado inhibe retrógradamente el primer paso del ciclo (catalizado por la carbamil fosfato sintetasa 1). Además, al ser inestable, puede descomponerse de nuevo dando amonio. El único marcador bioquímico diferencial entre el déficit de CPS1 y el de OTC es la presencia de ácido orótico en orina, resultado del escape del aumentadísimo carbamil fosfato mitocondrial al citosol, donde entra en la ruta de síntesis de pirimidinas, produciendo un gran exceso de orotato que no se puede utilizar, se excreta y aparece en la orina (Häberle y Rubio, 2014 y 2016).

En un estudio llevado a cabo por Arranz et al. en 2006, momento en el que se habían descubierto 341 mutaciones en *OTC*, se realizó una aproximación estadística, estudiando el caso de 23 nuevos pacientes con OTCD, y se estimó que el repertorio completo de mutaciones causantes de OTCD es de 560 mutaciones (intervalo de confianza del 95%, 422-833). De hecho, en una recopilación posterior realizada por Caldovic et al., en 2015, ya se habían identificado 417 mutaciones en el gen *OTC*, cifra que se aproxima al valor dado por Arranz et al. en 2006. De estas mutaciones la mayoría producen sustituciones de aminoácido, aunque también las hay que generan mutaciones de cambio de sentido, deleciones, duplicaciones o reordenamientos complejos que involucran el gen *OTC* (Caldovic et al., 2015).

Los pacientes con déficit de OTC pueden manifestar síntomas de intensidad variable en un gradiente que va desde irritabilidad, falta de energía y apetito, a letargia, convulsiones y progresión a coma o incluso la muerte (Matsumoto et al., 2019). En la forma más severa de OTCD, la forma neonatal, los pacientes, generalmente varones, presentan los primeros síntomas (rechazo al alimento, letargia, distress respiratorio y vómitos) los primeros días de vida, de manera que si no se trata presentan gran riesgo de morir (Häberle y Rubio, 2016). En cuanto a la forma tardía, los pacientes, hombres hemizigotos y mujeres heterocigotas, la sintomatología puede presentarse a partir de la infancia (Caldovic et al., 2015). En general, cuánto más leve la deficiencia, más tardía es su aparición y más fuerte ha de ser el estrés catabólico proteico que desencadena la aparición de los síntomas (Lichter-Konecki et al., 2013). Así, dichos síntomas pueden manifestarse en situaciones de estrés metabólico como la ingesta de comidas altamente proteicas, tratamientos con fármacos como el ácido valproico y esteroides, (Bursilow y Maestri, 1996). Aproximadamente el 20% de las mujeres heterocigotas manifiestan los síntomas de la

enfermedad (Maestri et al., 1998) en situaciones de estrés catabólico importante, tales como infecciones graves, cirugías o parto, pues el fenotipo en estas puede variar de asintomático a presentar síntomas significativamente graves en función del patrón de inactivación del cromosoma X en las células hepáticas (fenómeno de Lyonización). De manera que una mujer heterocigota puede presentar los síntomas de la enfermedad si en la mayor parte de sus células hepáticas está activo el cromosoma X con el alelo de la OTC patógeno (Lichter-Konecki et al., 2013).

Para lidiar con la OTCD, los pacientes que sufren esta deficiencia requieren de un tratamiento a largo plazo que promueva su crecimiento y evite episodios de hiperamonemia que puedan resultar fatales. La reducción en la ingesta de proteínas es la principal restricción a la que se enfrentan estos pacientes. El consumo de proteínas se reduce a la cantidad diaria requerida para permitir el crecimiento del individuo y prevenir el excesivo catabolismo de aminoácidos que aumente la concentración de amonio en sangre. Además, también se pueden emplear captadores de nitrógeno, fármacos como el fenilbutirato y benzoato de sodio, que proporcionan rutas alternativas para eliminar el amonio, permitiendo así a los pacientes una mayor ingesta de proteínas. Sin embargo, independientemente de cuán leve sea la OTCD, los factores estresantes pueden provocar a cualquier edad crisis hiperamonémicas que pueden llegar a ser potencialmente mortales. El trasplante de hígado es el único tratamiento curativo (Lichter-Konecki et al., 2013).

1.3.Ornitina transcarbamilasa humana (OTC)

En este proyecto he trabajado con la ornitina transcarbamilasa (OTC) humana, el enzima mitocondrial que cataliza el segundo paso del ciclo de la urea, consistente en sintetizar L-citrulina a partir L- ornitina y carbamil fosfato (Fig. 2), de acuerdo con la reacción:

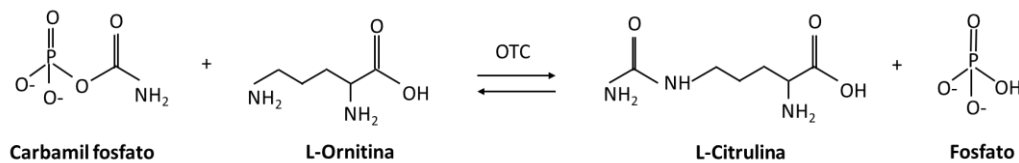


Figura 2. Reacción catalizada por la OTC humana.

Esta enzima consta un solo tipo de polipéptido de 354 residuos (entrada Uniprot KB, P00480) que es codificado por el gen *OTC* (GenBank NM_00531.6), localizado en el brazo corto del cromosoma X, concretamente en la banda Xp11.4. Este gen abarca 73 kb estando compuesto por 10 exones con tamaños comprendidos entre 54 y 154 pb y 9 intrones con tamaños de entre 80 pb y 21.7 kb (Hata et al., 1988). Este se transcribe dando lugar a un ARNm de 1849 pb de las cuales, 1062 pb se traducen para formar el péptido precursor de la OTC madura. Este péptido de 354 aminoácidos (39.9 kDa), contiene en su extremo N-terminal una secuencia señal de importación a mitocondria de 32 aminoácidos que es escindida al incorporarse a la matriz mitocondrial desde su punto de síntesis en los ribosomas extramitocondriales, dando una proteína madura de 322 aminoácidos (masa del polipéptido, 36.1 kDa) que se asocia en homotrímeros. Siendo la forma trimérica esencial para la funcionalidad del enzima, puesto que los centros activos del trímero incluyen residuos de dos subunidades adyacentes (Shi et al., 1998) (Fig. 3).

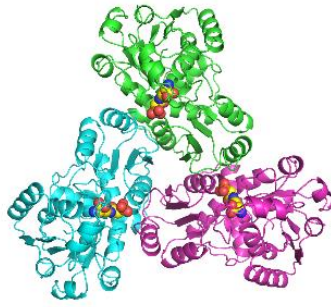


Figura 3. Estructura tridimensional de la OTC humana. Se representa un trímero de OTC humana (Shi et al., 1998) en modelo de cintas, con cada subunidad en un color distinto y moléculas de N- fosfanacetil- L- ornitina (PALO) unidas al centro activo de cada subunidad, en modelo de bolas.

1.4. ¿Por qué interesa producir la OTC humana recombinante pura?

Además de su función biológica, la OTC tiene un papel biotecnológico como enzima acoplado a la reacción que precede la suya propia, catalizada por la carbamil fosfato sintetasa 1 (CPS1). Aunque la OTC cataliza una reacción reversible (ornitina + carbamil fosfato \leftrightarrow citrulina + Pi), el equilibrio está altamente desplazado hacia a la síntesis de citrulina, algo que se consigue aún más si la reacción se lleva a cabo en ausencia de fosfato y en presencia de una elevada concentración de ornitina. Con esta estrategia es posible medir el muy inestable carbamil fosfato (CP) mediante su conversión a citrulina, mucho más estable y detectable cuantitativamente mediante una reacción coloreada muy sensible. En el laboratorio en el que he llevado a cabo mi trabajo, se realizan estudios varios relacionados con la determinación de la estructura, funcionamiento y actividad de la CPS1. Para llevar a cabo este tipo de estudios y medir su actividad y sus parámetros cinéticos una de las formas más simples es producir grandes cantidades de OTC pura, cuya reacción sirva de acoplamiento enzimático para medir la cantidad de CP. El laboratorio ha hecho uso de esta tecnología acoplada para realizar estudios de la actividad y los parámetros cinéticos de formas mutantes de la CPS1 humana producidas recombinantemente (Díez-Fernandez, 2015) y en biopsias obtenidas de pacientes (Sanjurjo et al., 1991, 1995).

Otra línea de investigación que se sigue en este laboratorio es la de las enfermedades raras, entre ellas la deficiencia de OTC humana, el error congénito más frecuente del ciclo de la urea. Esta enfermedad, está causada por mutaciones en el gen de la OTC dando lugar a proteínas alteradas que no cumplen su función óptimamente. Por tanto, para estudiar el impacto que tienen estas mutaciones sobre el plegamiento, la estabilidad y la actividad y los parámetros cinéticos sobre el enzima, en este laboratorio se produce la OTC humana pura recombinantemente para mediante mutagénesis dirigida, generar los mutantes clínicos descritos y evaluarlos. Por tanto, además de para entender el funcionamiento y comportamiento básico de la OTC es interesante producir la OTC humana recombinante para establecer correlaciones genotipo-fenotipo de las mutaciones estudiadas en los pacientes. Por todo esto, en este laboratorio se dispone de un sistema de producción OTC humana pura recombinante, que requiere la coexpresión esta enzima en presencia de chaperonas moleculares que la solubilizan, pues si no, la enzima no es soluble.

Se ha visto, además, en estudios realizados (Briand et. al 1982) que la mayoría de pacientes varones con déficit de OTC carecen de proteína OTC en el tejido hepático. Como la mayor parte de las mutaciones que se dan en el déficit de OTC son mutaciones puntuales de cambio de sentido (Arranz et al. 2006) es evidente que dichas mutaciones deben producir mal plegamiento y pérdida de la proteína en el tejido, como corroboró en estudios experimentales piloto la tesis doctoral realizada en el laboratorio por la Dra. C. Climent (2000). Por eso el laboratorio está implicado en iniciativas que tratan de desarrollar algún tipo de fármaco que estabilice la proteína y eleve así la concentración en algunas formas mutantes a niveles tolerables para no padecer el déficit de la misma, mitigando así el efecto de las mutaciones desestabilizadoras. Para llevar a cabo estudios en esta dirección y poner en marcha ensayos de búsqueda de moléculas con función de farmacochaperonas es necesario disponer de OTC humana recombinante. Por ello, en este laboratorio, además de las dos utilidades mencionadas que se le da a la OTC, esta última se produce en grandes cantidades para someterla por grupos colaboradores a estudios automatizados de cribado de bibliotecas de compuestos con la finalidad de identificar posibles moléculas pequeñas con capacidad de ser utilizadas como farmacochaperonas.

1.5. Métodos de purificación de OTC humana recombinante

Por las tres razones descritas en el apartado anterior es de especial interés producir en el laboratorio la OTC humana recombinante con una pureza adecuada. Aunque Pierson et al. obtuvieron en 1977 la OTC humana purificada a partir de hígado humano, esta aproximación no es práctica, es costosa, presenta riesgos biológicos y no permite la preparación de formas mutantes a voluntad. Por ello es necesaria la producción recombinante en un organismo heterólogo. La producción OTC humana recombinante se llevó a cabo por primera vez por Tuchman et al. en 1997 y tuvo éxito gracias al uso de sistemas de chaperonas moleculares bacterianas que evitaron la precipitación de la proteína durante la purificación. Por ello, en el sistema de producción que empleamos en este trabajo y el que se venía utilizando en el laboratorio hasta el momento, se coexpresa la OTC con las chaperoninas moleculares GroEL/ES. El sistema GroEL/ES de *E. coli* es uno de los más estudiados de la clase chaperoninas moleculares (Madan et al., 2008) y es el homólogo bacteriano de hsp60 y hsp10, una chaperona caracterizada en un gran espectro de especies, entre ellas la humana (Xinxiang et al., 1992). Este sistema se emplea en el laboratorio para solubilizar la OTC humana recombinante producida en bacterias, pues ayuda al ensamblaje oligomérico al prevenir la formación de agregados de proteínas inadecuados. La chaperonina GroEL está formada por anillos homoheptaméricos, de los cuales dos, con 7 subunidades de 57 kDa, se apilan adoptando un aspecto cilíndrico. La cochaperonina GroES es un anillo heptamérico de una sola capa que consta de siete subunidades de 10 kDa, que se adhiere a los extremos del cilindro de GroEL. Ambos complejos forman una nano-jaula en la que la cadena polipeptídica se encierra de forma transitoria y se pliega correctamente (Ishii, 2017)

Hasta el momento se han descrito dos métodos de purificación de OTC humana recombinante. El primero de ellos, que se emplea habitualmente en este laboratorio, está basado en la purificación de la OTC por cromatografía de intercambio iónico acoplada a un sistema FPLC y se realiza en un sistema de expresión en *E. coli* coexpresando la forma madura de la OTC con GroEL/ES pues facilitan plegamiento y la solubilizan (Shi et al., 1998). Este procedimiento,

modificado del descrito por Pierson en 1977 (que a su vez modificaba otros previos para OTC bovina (Marshall y Cohen 1972)) tiene como desventaja el tiempo requerido para llevarlo a cabo, además de que implica cinco etapas, incluyendo precipitación con sulfato de protamina, dos pasos de precipitación con sulfato amónico, diálisis y cromatografía de intercambio iónico.

Por otro lado, existe un procedimiento de purificación de la OTC por cromatografía de afinidad que (Mori et al. 1977; Hoogenraad et al., 1980) que usa como ligando el N-5-fosfonacetil-L-ornitina (PALO) un potente inhibidor de la OTC análogo del estado de transición de la reacción catalizada por la OTC (Mori et al., 1977), que combina en una sola molécula la mayoría de las características estructurales de los dos sustratos o de los dos productos de la reacción catalizada por la OTC (Hoogenraad et al., 1980). Aunque esta alternativa es muy útil, tiene el defecto de que requiere de la síntesis de dicho compuesto pues este no se encuentra disponible comercialmente, lo que limita mucho la utilización de esta alternativa de purificación a la mayoría de laboratorios.

Dadas las complicaciones que tienen cada uno de los métodos de purificación de OTC descritos y dado que hasta el momento no se ha utilizado un método de purificación de OTC basado en etiqueta de polihistidinas, se ha propuesto este proyecto con el fin último de desarrollar un método más rápido y sencillo de purificación de este enzima. Con este trabajo nos hemos propuesto introducir una etiqueta de polihistidinas en un extremo u otro de la OTC humana producida recombinantemente que facilite su purificación por cromatografía de afinidad a níquel. Debido que a priori se desconoce el posible efecto que pueda tener la inserción de esta extensión de polihistidinas en la proteína, se han planteado dos alternativas; la producción de una forma de OTC que añada la etiqueta de polihistidinas en el extremo N-terminal y otra que la introduzca en el C-terminal, empleando vectores de expresión adecuados para cada alternativa. Clonadas las proteínas, se han evaluado su expresión y su solubilidad en células *E. coli*, deficientes en proteasas, para una vez comprobadas, producirlas a gran escala y purificarlas por cromatografía de afinidad a níquel para ensayar su actividad y compararla con la actividad del enzima sin etiqueta que se venía produciendo en el laboratorio, con el método clásico, que también hemos probado aquí.

Los ensayos de actividad realizados con las dos formas de OTC con etiqueta producidas demostraron que estas presentan una actividad catalítica significativamente inferior al enzima sin etiqueta. Por ello, se llevó a cabo la digestión de la etiqueta de polihistidinas de una de las formas de OTC con la proteasa TEV seguido de la aplicación piloto de un sistema de purificación rápida partiendo de volúmenes de cultivo pequeños y empleando una pequeña columna de afinidad de níquel en centrífuga. Hemos visto que la escisión de la etiqueta recupera la actividad y los parámetros cinéticos de la OTC, que son comparables a los obtenidos con el enzima de referencia.

2.OBJETIVOS

Este trabajo tiene como principal objetivo explorar la posibilidad de utilizar las etiquetas de polihistidinas para poner a punto una purificación rápida de OTC humana madura en un sistema de expresión recombinante bacteriano. Para ello, se han desarrollado los siguientes objetivos específicos:

- Clonación de la secuencia codificante para la OTC humana (HuOTC) madura (es decir, sin secuencia de direccionamiento mitocondrial) en dos plásmidos, uno de los cuales fusiona la etiqueta de polihistidinas a la OTC en su extremo N-terminal y el otro en el extremo C-terminal.
- Sobreexpresión de las proteínas con la etiqueta de polihistidinas en células BL21 de *E. coli* en presencia de chaperoninas moleculares que las solubilizan.
- Purificación de las proteínas etiquetadas usando cromatografía de afinidad a níquel con el sistema AKTA FPLC.
- Con la finalidad de referencia y comparación, purificación de la HuOTC sin etiqueta a partir de un vector de la familia pET, del modo que se ha hecho hasta ahora en el laboratorio.
- Evaluar la funcionalidad y actividad de los enzimas con etiqueta y compararla con el enzima carente de etiqueta que se producía previamente en el laboratorio.
- Proceder a la escisión de la etiqueta en N-terminal mediante un procedimiento de corte proteolítico selectivo, y proceder a la purificación rápida de afinidad de la proteína sin etiqueta para evaluar las propiedades de la misma.

3.MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.Obtención del DNA molde

Para producir HuOTC con etiqueta de polihistidinas (His₆) he subclonado en dos vectores adecuados la región de interés del cDNA del gen humano *OTC* (NM_00531.6) mediante una estrategia de amplificación por PCR usando como molde pET22b-HuOTC, un plásmido preparado con anterioridad en el laboratorio (Climent, 2000) que tiene clonada la región que comienza en el nucleótido 97 del gen *OTC* y acaba 51 nucleótidos tras el codón de terminación de este gen. Precisamente, es a partir de dicho plásmido pET22b-HuOTC como se produce recombinantemente en el laboratorio la HuOTC madura sin etiquetas, correspondiente a la región que incluye los aminoácidos 33-354 de la *OTC* humana (Uniprot KB P00480) (Climent, 2000). A partir de ahora, cuando nos refiramos al gen *OTC*, este corresponderá a los nucleótidos 97- 1062 de la porción codificante de su cDNA y cuando nos refiramos a la *OTC*, corresponderá a la proteína humana madura, es decir, sin señal de importe mitocondrial.

Para el uso del pET22b-HuOTC como DNA molde, extraje dicho plásmido a partir de las células *E. coli* DH5 α que lo portaban siguiendo el procedimiento de Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) explicado en el apartado de metodología general. El DNA plasmídico extraído se cuantificó midiendo la absorbancia a 260 nm en Nanodrop 1000, y se secuenció utilizando como cebadores T7 promotor y terminador (Tabla 1), en el servicio de secuenciación del IBMCP-CSIC para comprobar que la secuencia de la región clonada era correcta. Para ello, se tradujo la secuencia proporcionada por el servicio de secuenciación en sus diferentes pautas usando el programa GeneRunner (<http://www.generunner.net/>) y se seleccionó la pauta correspondiente a la *OTC*, que se alineó con su secuencia aminoacídica de referencia (Uniprot KB- P00480) utilizando ClustalW (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>).

Tabla 1. Oligonucleótidos empleados y sus correspondientes temperaturas predichas de fusión (T_m (° C)).

Cebador		Secuencia	T _m (° C)
pLIC-HuOTC	Directo	5' TACTTCCAATCCATGAATAAAGTGCAGCTGAAG 3'	58,6
	Reverso	5' TATCCACCTTTACTGTCAAAAATTTAGGCTTCTGGAG 3'	59,9
pOPINE-HuOTC	Directo	5' AGGAGATATACCATGAATAAAGTGCAGCTGAAGG 3'	58,3
	Reverso	5' GTGATGGTGATGTTTAAATTTAGGCTTCTGGAG 3'	57,6
T7 promotor	Directo	5 'TAATACGACTCACTATAGGG 3'	29,7
T7 terminador	Reverso	5' GCTAGTTATTGCTCAGCGG '3	38,8
PHLseq	Reverso	5' GGCAGCCTGCACCTGAG 3'	41,5

3.2.Clonación en pLIC-SGC1

3.2.1.Extracción y linealización del vector pLIC- SGC1

Para producir la *OTC* con una etiqueta de polihistidinas en el extremo N-terminal (His₆-*OTC*), se clonó el gen *OTC* en el plásmido pLIC-SGC1 (7505 pb, Addgene), un plásmido que confiere resistencia a la ampicilina y que se emplea para sobreexpresar proteínas heterólogas en bacterias. Dado el diseño, la clonación apropiada en este plásmido introduce la secuencia

MHHHHHSSGVDLGTENLYFQS en el extremo N-terminal de la proteína codificada por la región clonada. Esta etiqueta incluye la diana de corte para la proteasa TEV proteasa, y por tanto permite escindir la etiqueta (salvo la serina carboxiterminal de la etiqueta) de la proteína sobreexpresada.

El plásmido pLIC-SGC1 contiene un gen de toxicidad, SacB, que es sustituido por el fragmento de DNA clonado tras la digestión del vector con el enzima de restricción BseRI y el tratamiento con la T4 polimerasa. Este plásmido codifica también para el represor lacI, que en ausencia de IPTG se une al promotor de la T7 polimerasa e impide la transcripción del gen de interés y permite así la expresión controlada del mismo. El plásmido se obtuvo a partir de células DH5 α que lo contenían, realizando una Miniprep (ver metodología general) y se cuantificó espectrofotométricamente (Nanodrop).

La digestión del vector pLIC- SGC1 se realizó en un volumen final de 100 μ l, con 5 μ g de vector, 12 U de enzima BseRI, 1 μ l de BSA (1 mg/ml) y 10 μ l de tampón CutSmart x10 (New England Biolabs). Esta mezcla de reacción se incubó durante 3 horas a 37 $^{\circ}$ C tras las cuales el enzima fue inactivado calentando a 65 $^{\circ}$ C durante 20 min. Esta reacción se comprobó corriendo 5 μ l del producto de digestión (250 ng de plásmido digerido) en una electroforesis en gel de agarosa al 1 % (ver metodología general), utilizando como control negativo, el plásmido sin digerir.

El vector pLIC- SGC1 digerido se purificó a partir de la banda correspondiente (cortada de un gel de agarosa en el que previamente se había separado electroforéticamente el resto de producto de digestión) utilizando el kit GeneClean $^{\circ}$ Turbo Kit (de MPbio) como sigue (siendo todos los pasos de centrifugación en centrífuga 5415R A 3500 g). La banda cortada del gel se introdujo en un tubo Eppendorf de 1.5 ml y por cada 100 mg de gel se añadieron 100 μ l de Turbo Salt solution del kit. El gel se licuó en el mismo Eppendorf incubando la mezcla a 55 $^{\circ}$ C durante 5 min. Pasado este tiempo se transfirieron 600 μ l de dicha mezcla a la columna proporcionada por el kit, centrifugando 5 s. Este paso se repitió hasta pasar toda la muestra por la columna. Posteriormente la columna se lavó con 500 μ l de la solución de lavado del kit, se centrifugó 4 minutos y se cambió el tubo recolector para centrifugar 1 min y eluir así el DNA en 30 μ l de agua. La concentración de plásmido digerido se cuantificó midiendo la absorbancia a 260 nm.

3.2.2.Tratamiento del vector PLIC-SGC1 linealizado con T4 polimerasa

El vector linealizado se trató con T4 polimerasa como sigue. Se usaron 15 U de T4 polimerasa (New England Biolabs) y 190 ng del vector digerido en un volumen de 0.1 ml del tampón recomendado por la casa comercial (NEBuffer 2) en la dilución apropiada, con 2.5 mM de dGTP y 5 mM de ditiotreitól (DTT). Tras centrifugar 1 minuto a 14000 g se incubó la mezcla en un termociclador Eppendorf AG 22331 programado para un primer ciclo de 30 min a 22 $^{\circ}$ C seguido de otro del mismo tiempo a 75 $^{\circ}$ C.

3.2.3.Preparación de inserto

En cuanto al inserto a introducir en el vector, se preparó por amplificación por PCR a partir de un molde adecuado (ver más adelante).

- Diseño de cebadores

Para ello hubo que diseñar cebadores apropiados, lo que se hizo a partir de la secuencia del gen de la OTC humana (NM_00531.6), siguiendo las recomendaciones para clonar en el plásmido pLIC-SGC1 (Addgene) de modo que 1) la longitud de la región del cebador que hibrida con el gen OTC tuviera 20-25 pares de bases; 2) que el contenido de C/Gs fuera del 40-60%; 3) que la temperatura de fusión para los distintos cebadores a hibridar con el DNA diana (T_m) fuera similar para todos ellos; 4) que las secuencias fueran tales que se minimizara la posibilidad de formar estructura secundaria interna.

El cálculo de la T_m y la potencialidad de formar estructura secundaria se analizaron mediante el programa GeneRunner (<http://www.generunner.net/>). En la Tabla 1 se indican los cebadores utilizados en el trabajo y sus T_m correspondientes.

Los cebadores diseñados se recibieron como liofilizados y se resuspendieron en la cantidad de agua indicada por la casa comercial que los proveyó (Sigma) para obtener una concentración de 100 μM . Tras corroborar espectrofotométricamente la concentración, se prepararon alícuotas de trabajo de 10 μM y se almacenaron a $-20\text{ }^\circ\text{C}$.

- Amplificación del gen OTC

Con estos cebadores, se amplificó la región codificante de la HuOTC madura mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando por su elevada fidelidad, la polimerasa termoestable Kapa Hifi PCR kit (KAPA Biosystems). La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 50 μl y los reactivos empleados se indican en la Tabla 2.

Tabla 2. Preparación de la mezcla de reacción utilizada para la PCR. En la aplicación del inserto para clonar en pLIC-SGC1, los oligos empleados fueron pLIC-HuOTC directo (Oligo D) y pLIC-HuOTC reverso (Oligo R). En la clonación en pOPINE, los oligos empleados fueron pOPINE-HuOTC directo (Oligo D) y pOPINE-HuOTC (Oligo R).

Reactivos	$\mu\text{l}/\text{tubo}$	Mix x 2,5 (μl)	[] final
dNTPs 10 mM	1,5	3,75	0,3 mM cada uno
Oligo D 10 μM	1,5	3,75	0,3 μM
Oligo R 10 μM	1,5	3,75	0,3 μM
Tampón 5x KAPA Fidelity	10	25	1x
Polimerasa KAPA 1 U/ μl	1	2,5	1 U
pET22b-HuOTC (62,5 ng/ μl)	1	0	-
H ₂ O	33,5	83,75	N/C
Total	50	125	-

La reacción se llevó a cabo en el termociclador Eppendorf AG 22331 en las siguientes condiciones: un ciclo de desnaturalización inicial de 3 min a $95\text{ }^\circ\text{C}$; 30 ciclos que incluyen una primera etapa de desnaturalización de 20 s a $98\text{ }^\circ\text{C}$, una etapa de hibridación de 15 s a $58\text{ }^\circ\text{C}$ y una tercera etapa de elongación a $72\text{ }^\circ\text{C}$ durante 45 s; y por último una extensión final de 1 min a $72\text{ }^\circ\text{C}$.

La adecuada amplificación (966 pb), se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa al

1%, en el cual se cargaron 5 µl del producto de PCR y 1 µl del tampón de carga 6x (30% glicerol, 0.25% azul Bromofenol, 0.25% xylene cyanole FF). El resto del producto de la reacción se purificó usando el kit GeneClean[®] Turbo (MPbio), siguiendo el protocolo descrito anteriormente, cuantificándose espectrofotométricamente (Nanodrop) lo recuperado.

- **Tratamiento con T4 polimerasa del producto de PCR**

También se trató con T4 polimerasa el producto de PCR en presencia de dCTP con el objetivo de generar extremos de cadena simple complementarios a los extremos del vector linealizado y tratado con T4 polimerasa en presencia de dGTP. La reacción, realizada en un volumen final de 10 µl, contenía 1.5 U de T4 polimerasa (New England Biolabs), 2.5 mM de dCTP, 5 mM de DTT, 0.1 µg de Albúmina de suero bovino (BSA), 180 µg del producto de PCR y 1 µl del tampón recomendado por la casa comercial (NEBuffer 2). Esta reacción se incubó utilizando un termociclador (Eppendorf AG 22331) en las siguientes condiciones: 30 min a 22 °C y 20 min a 30°C.

3.2.4.Ligación

La integración del inserto en el vector digerido, ambos tratados con T4 polimerasa como se ha descrito anteriormente, se realizó probando mezclas vector:inserto en proporciones en ng de 38:18, y 57:18 que corresponden a relaciones molares 20:1 y 30:1, respectivamente. La mezcla se incubó 10 min a temperatura ambiente para favorecer la integración.

3.2.5.Transformación

Todo el producto de la integración se transformó en 100 µl de células de *E. coli* TopTen competentes (0.6×10^{10} células/ml). La mezcla se incubó durante 30 min en hielo y fue sometida a un choque térmico de 45 s a 42 °C, seguido de 2 min en hielo antes de añadir 150 µl de medio LB sin antibióticos. Las células se incubaron en agitación a 37 °C durante 45 min para permitir su recuperación y a continuación se sembraron en placas LB agar suplementadas con 0.1 mg/ml de ampicilina dejándose incubar a 37 °C durante toda la noche.

3.2.6.Selección de transformantes y secuenciación

De las colonias crecidas aisladas tras la transformación, se seleccionaron 10, a partir de las cuales se hizo una PCR para comprobar si se había insertado en el plásmido un fragmento del tamaño esperado. Para ello se preparó un cóctel de reacción con los reactivos que se indican en la Tabla 3, del que se alicuotó 25 µl en tubos de PCR. Se picó cada una de las colonias seleccionadas con una punta de micropipeta estéril y se mojó en una alícuota del cóctel de reacción, utilizándose de este modo como molde de reacción. Asimismo, se incluyeron un control positivo en el que se añadió al cóctel de reacción 62.5 ng de la construcción pET22b-uOTC como molde y un control negativo que únicamente contenía el cóctel de reacción, sin molde alguno. La amplificación se llevó a cabo en el termociclador Eppendorf AG 22331 en las siguientes condiciones: un ciclo de 2 min a 98 °C, 30 ciclos de 20 s a 95 °C, 30 s a 58 °C y 3 min a 72 °C, y por último un ciclo de 7 min a 72 °C.

Tabla 3. Mezcla de reacción utilizada para la PCR a partir de colonia. En la clonación en pLIC-HuOTC, los oligos D y R corresponden a T7 promotor y terminador, respectivamente. En la clonación pOPINE, los oligos D y R corresponden a T7 promotor y PHLseq, respectivamente (Tabla 1).

Reactivos	µl/tubo	Mix x 12 (µl)	[] final
dNTPs 10 mM	0,5	6	0,2 mM cada uno
Oligo D 10 µM	1	12	0,4 µM
Oligo R 10 µM	1	12	0,4 µM
Tampón Biotools x10	2,5	30	1x
MgCl ₂ 50 µM	1	12	3,5 mM
DMSO 100%	0,3	3,6	1%
Biotools DNA pol 5U/µl	0,3	3,6	60 mU
H ₂ O	18,4	220,8	N/C
Total	25	300	-

Secuencialmente, con la misma punta de micropipeta estéril utilizada para inocular los tubos de PCR se sembró haciendo una estría en una placa LB agar con ampicilina 0.1 mg/ml y se utilizó para inocular un cultivo de 5 ml de LB con ampicilina 0.1 mg/ml que sirvieron para la posterior extracción del DNA plasmídico. La placa y los cultivos se incubaron a 37 °C durante toda la noche.

Los productos de cada una de las reacciones de PCR fueron analizados electroforéticamente corriendo una mezcla de 5 µl de la muestra y 1 µl de tampón de carga 6x en un gel de agarosa al 1%. Cuatro de las colonias para las que se observó en la electroforesis una banda del tamaño esperado para la región del gen de la OTC humana clonada, se seleccionaron para extraer el DNA plasmídico mediante Miniprep. Previamente a la extracción del DNA plasmídico, se utilizaron los cultivos correspondientes para preparar glicerizados (ver metodología general).

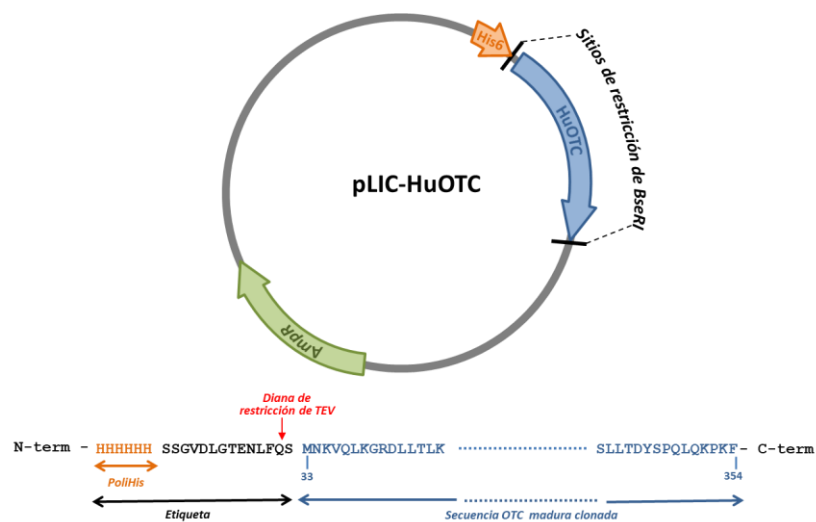


Figura 4. Esquema de la construcción pLIC-HuOTC. En el panel inferior, se muestra la secuencia aminoacídica de la etiqueta añadida en el extremo N-terminal de la proteína, que incluye la región de polihistidinas y el sitio de corte de la proteasa TEV, así como las secuencias flanqueantes de la región de OTC clonada.

La determinación de la concentración de cada una de las construcciones de pLIC-SGC1 con el gen OTC (a partir de ahora pLIC-HuOTC) extraídas por Miniprep se obtuvo midiendo la absorbancia a 260 nm en Nanodrop. Los plásmidos extraídos y cuantificados se secuenciaron en el servicio de secuenciación del IBMCP-CSIC con el fin de comprobar que la secuencia del gen

OTC clonada era correcta, utilizando como cebadores, el T7 promotor y terminador (Tabla 1).

3.3. Clonación en pOPINE

La producción de *OTC* humana con la etiqueta de polihistidinas en el extremo C-terminal (*OTC*-His₆) se realizó clonando el gen *OTC* en el plásmido pOPINE (Addgene), un plásmido que contiene el gen de resistencia a la ampicilina y que se utiliza para clonar y expresar proteínas recombinantes en bacterias. El plásmido pOPINE contiene un sistema de inducción de expresión de proteínas con IPTG al estar bajo control del gen *lacZ* α . A diferencia del pLIC-SGC1 la clonación en este vector se realizó utilizando la tecnología In-fusion, un método de clonación que al igual que la tecnología LIC es independiente de ligasa. Mediante este sistema se pueden clonar uno o más fragmentos de DNA en un vector, generando previamente en los extremos del inserto, regiones complementarias a las que flanquean el sitio de inserción en el vector. Estas regiones (overhangs) suelen ser de aproximadamente 15 pb y se generan tal y como yo hice para amplificar en el inserto. Cuando ambos componentes se incuban con la mezcla de enzimas In-fusion, se generan extremos de cadena simple complementarios que hibridan y permiten la ligación del vector y el inserto (TAKARA BIO GROUP, 2018).

3.3.1. Diseño y preparación de cebadores

El diseño de los cebadores para clonar el gen *OTC* en pOPINE (Addgene) se realizó siguiendo las instrucciones indicadas para la clonación con el sistema In-fusion en este plásmido, además de las características básicas de diseño de cebadores mencionadas anteriormente. El cálculo de Tm utilizado para optimizar el diseño de cebadores se realizó con el programa informático GeneRunner. Los cebadores diseñados y sus correspondientes Tms se muestran en la Tabla 1. La preparación de cebadores se realizó igual que en la sección 3.2.3., en “Diseño de cebadores”.

3.3.2. Preparación del inserto

La porción a clonar del cDNA para el gen *OTC* se amplificó utilizando como medio de reacción el indicado en la tabla 2, salvo que en este caso se usaron los cebadores pOPNE-HuOTC directo y reverso (Tabla 1). Se incluyó un control negativo en el que el molde de DNA fue sustituido por el mismo volumen de agua. La reacción se llevó a cabo en el termociclador Eppendorf AG 22331 utilizando el mismo programa que el indicado en la amplificación del gen para la clonación en pLIC-SGC1, a excepción de la etapa de hibridación que para pOPINE fue de 55 °C. La amplificación se comprobó realizando una electroforesis en gel de agarosa al 1% con 5 μ l del producto de PCR y 1 μ l de tampón de carga 6x.

3.3.3. Reacción In-fusion

A diferencia de la clonación en pLIC-SGC1, para clonar en pOPINE no extraje y digerí el plásmido, pues éste había sido preparado con anterioridad en el laboratorio y se me proporcionó ya linealizado mediante digestión con los enzimas de restricción NcoI y MscI (Fig. 5) lo cual deja accesibles los sitios de recombinación incluidos en los extremos del inserto. La reacción de

ligación se realizó en un volumen final de 5 µl en la que se utilizó 1 µl de 5x In-fusion HD enzyme premix (Clontech) 1 µl del vector linealizado (360 ng), 1 µl del producto de PCR (90 ng) y agua milliQ. La reacción se incubó 15 minutos a 38° C y posteriormente 15 min a 50 °C, usando para ello un termociclador Eppendorf AG 22331.

3.3.4. Transformación

La mezcla completa de la reacción In-fusion se transformó en células *E. coli* Top Ten competentes (0.6×10^{10} células/ml) siguiendo el protocolo de transformación por choque térmico descrito anteriormente.

3.3.5. Selección de transformantes y secuenciación

De las colonias crecidas tras la transformación se seleccionaron 9 para realizar una PCR a partir de colonia siguiendo el mismo procedimiento que el descrito en la sección 3.2.6.

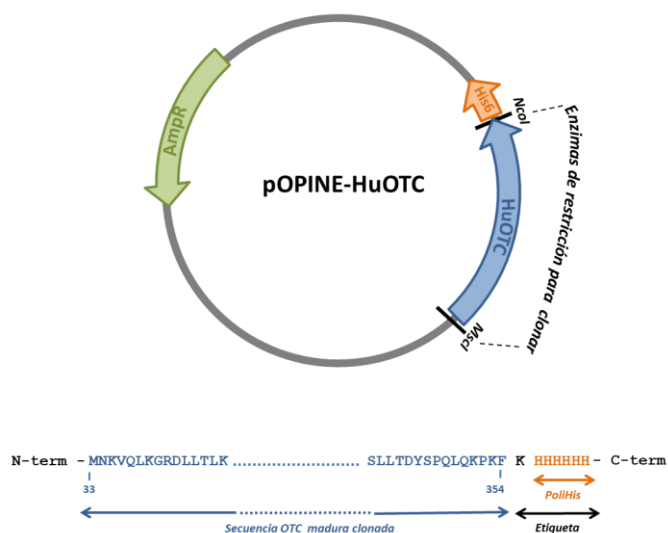


Figura 5. Esquema de la construcción pOPINE-HuOTC. En el panel inferior, se muestran las secuencias de aminoácidos de la etiqueta añadida en el extremo C-terminal de la proteína y que incluye la extensión de polihistidinas y las secuencias flanqueantes de la región de OTC clonada.

Al igual que he explicado antes, en paralelo a estas reacciones PCR, se crecieron cultivos para extraer DNA plasmídico y comprobar mediante secuenciación, usando los cebadores T7 promotor y PHLseq (Tabla 1), que la secuencia de la región clonada del gen *OTC* era correcta.

3.4. Transformación de las construcciones en *E. coli* BL21

La expresión de OTC recombinante se realizó en células de *E. coli* de la cepa BL21 (DE3) (Novagen), células deficientes en proteasas, que contienen el gen de la T7 RNA polimerasa y que por tanto son adecuadas para la expresión heteróloga de proteínas cuyo gen está bajo el control del promotor T7. Para ello se introdujeron los plásmidos pLIC-HuOTC o pOPINE-HuOTC se introdujeron en estas células (2×10^{11} células/ml), preparadas previamente para ser electrocompetentes. Se añadió 1 µl de construcción pLIC-HuOTC (99,5 ng) o pOPINE-HuOTC (147 ng) en 40 µl de BL21 (DE3), se introdujo la mezcla en una cubeta de electroporación (1 mm Electroporation Cuvettes Catalog · 5510- 11 de Molecular BioProducts) y se aplicó un pulso de

1700 Kvólts/cm² con el electroporador Eppendorf 2510 para generar poros en las células que permitieran la entrada de la construcción en las mismas. A continuación, se añadieron 200 µl de LB sin antibiótico y se incubó el cultivo en agitación 45 min a 37° C para favorecer la recuperación de las células transformadas. Pasado este tiempo se sembraron 50 µl en placas LB agar con ampicilina (0.1 mg/ml) y se incubaron toda la noche a 37° C.

El mismo procedimiento se realizó para cotransfectar las células con 1 µl de las construcciones (pLIC-HuOTC o pOPINE-HuOTC) y 1 µl pGroEL/ES (606 ng; proporcionado por Dr.Gatenby, Dupont de Nemours, Wilmington). Este último, confiere resistencia al cloranfenicol y codifica las chaperoninas bacterianas GroEL y GroES, proteínas que facilitan el correcto plegamiento de las proteínas recombinantes, favoreciendo su solubilidad. En estos casos, los medios utilizados fueron suplementados tanto con 0.1 mg/ ml de ampicilina (resistencia conferida por pLIC-HuOTC o pOPINE-HuOTC) como con 0.035 mg/ml de cloranfenicol (resistencia conferida por pGroEL/ES).

En todos los casos, se prepararon glicerizados (metodología general) a partir de colonias aisladas, creciendo estas a saturación en medio de cultivo líquido en presencia de los antibióticos y suplementados con glicerol tal y como se ha descrito en metodología general. Los glicerizados se conservaron a -80 °C.

3.5.Prueba de expresión y solubilidad de OTC recombinante

El protocolo usado para sobreexpresar la OTC ha sido en todos los casos el empleado previamente en el laboratorio para sobreexpresar este enzima a partir de pET22b-HuOTC. Por tanto, el procedimiento que se explica a continuación fue el mismo independientemente de partir de glicerizados BL21 con pET22b-HuOTC y pGroEL/ES, pLIC-HuOTC, pLIC-HuOTC y pGroEL/ES, pOPINE-HuOTC o pOPINE-HuOTC y pGroEL/ES.

Para la prueba de expresión, se inocularon cultivos de 100 ml a partir de 5 ml del precultivo correspondiente saturado preparado a partir del glicerizado (con ampicilina o ampicilina y cloranfenicol según corresponda, tal y como se ha explicado anteriormente). Los cultivos se incubaron a 25° C en agitación y se monitorizó su crecimiento midiendo su absorbancia a 600 nm. Cuando los cultivos alcanzaron la fase exponencial de crecimiento (densidad óptica entre 0.5 y 0.6) se separó 1 ml de cultivo para analizar el contenido proteico de las bacterias, que previsiblemente no debía tener sobreexpresada OTC y por tanto podríamos considerar como control negativo de la expresión de la OTC. Tras esto, se indujo la expresión de la OTC recombinante con 0.01 mM isopropil-β-D-tiogalactósido (IPTG), continuando el cultivo a 25 °C en agitación durante 16- 17 horas. Pasado este tiempo, se volvió a separar 1 ml del cultivo para realizar una prueba de expresión de la proteína. Tanto el ml de cultivo recogido antes de inducir, como el recogido tras la inducción, fueron centrifugados a 4 °C durante 15 min a 15000 g. Tras la centrifugación se eliminó el medio y se resuspendió el precipitado celular en 1 ml de tampón de lisis (Tris acetato 20 mM, NaCl 0.1 M, EDTA 2 mM, PMSF 100 µl).

Para analizar la solubilidad de la proteína, se centrifugaron los cultivos (aproximadamente 100 ml) a 3200 g durante 30 min a 4 °C, se resuspendió el precipitado en 4 ml de tampón de lisis y se sonicó con la sonda mediana (9.5 mm tip titanium probe) del sonicador Soniprep 150 MSE,

de Sanyo). Para ello, el tubo con la muestra se colocó en un baño de agua y hielo y se aplicaron 15 pulsos de 15 s con descansos de 45 s entre cada pulso a 12 μm de amplitud. Las fracciones soluble e insoluble se separaron mediante centrifugación a 15500 g durante 30 min a 4 $^{\circ}\text{C}$.

La expresión y solubilidad de las proteínas producidas se analizó mediante SDS-PAGE en geles al 12%. Para cada muestra se cargaron 10 μl (extracto total, fracción soluble o insoluble) a la que se adicionó 10 μl de agua y 5 μl de tampón de carga para SDS-PAGE 5x, consistente en una solución de 312.5 mM Tris HCl pH 6.8, 2.2 M β -mercaptoetanol, 10% SDS, 43.8% glicerol y 0.02% azul de bromofenol, calentando la mezcla durante 5 minutos a 100 $^{\circ}\text{C}$.

3.6.Purificación de OTC recombinante

En este trabajo se han seguido distintos procedimientos para purificar la OTC humana recombinante. En todos ellos la purificación se ha llevado a cabo a partir de cultivos de células BL21 (DE3) que se habían cotransformado con la construcción de interés (pET22b-HuOTC, pLIC-HuOTC o pOPINE-HuOTC) y pGroEL /ES. A continuación, daré el detalle experimental de cada uno de ellos.

Las muestras y los tampones se mantuvieron a 4 $^{\circ}\text{C}$ a lo largo de todos los procedimientos de purificación

3.6.1.Purificación de OTC recombinante sin etiqueta

Para realizar la purificación de la OTC recombinante carente de etiqueta (codificada en pET22b-HuOTC); utilizada convencionalmente en el laboratorio, se obtuvieron células a partir de 0.5 L de cultivo inoculado con 20 ml de precultivo en las mismas condiciones que las descritas en el apartado de “Expresión y solubilidad de la OTC recombinante”. Las células recogidas por centrifugación se lisaron por sonicación de igual manera que la explicada en el apartado anterior excepto porque el precipitado celular se suspendió en 20 ml de tampón de lisis y se aplicaron 20 pulsos de 15 s con descansos de 45 s entre cada dos pulsos. Tras la sonicación, la muestra se centrifugó a 15000 g durante 30 min a 4 $^{\circ}\text{C}$ y al sobrenadante se le añadió sulfato de protamina al 1.5% en tampón de lisis para tener una concentración final de 0.5%. La mezcla se mantuvo en agitación durante 15 min en un baño de hielo y agua y se volvió a centrifugar a 15500 g durante 20 min. Tras descartar el precipitado se midió el volumen de sobrenadante y se le añadieron 0.35 g de sulfato amónico por cada ml, para así alcanzar una molaridad de 3.6 M, repitiendo el periodo de agitación y la centrifugación.

El precipitado de la última centrifugación, donde se espera que se encuentre la OTC, se resuspendió en 5 ml de tampón A (trietanolamina 10mM pH 8 conteniendo EDTA 1 mM) y se dializó frente a este mismo tampón con el objetivo de reducir la concentración de sales en la muestra. La diálisis se realizó a 4 $^{\circ}\text{C}$, en dos pasos ambos frente a 1L de tampón A nuevo siendo la primera fase de 3 horas y la segunda toda la noche. En ambos se mantuvo agitación suave del tampón de diálisis para favorecer el proceso de diálisis.

La muestra dializada se filtró a través de una membrana de 0.45 μm (Filtropur S REF 83.1826, de Sastedt) y se cargó haciendo varias inyecciones en una columna de intercambio iónico (Hi

Trap QHP de 5 ml; GE Healthcare) acoplada a un sistema de cromatografía líquida de proteína rápida (AKTA FPLC “Fast Protein Liquid Chromatography”, GE Healthcare) y equilibrada con el tampón de diálisis, lavando con el mismo tampón hasta que la absorción óptica del efluente de la columna (a 260 nm) volvió a valores basales. La proteína no se retiene en este paso y queda ya muy pura, como prueba el análisis electroforético del efluente de la aplicación de la muestra y de su lavado.

3.6.2. Purificación de OTC recombinante con etiqueta His₆

- Procedimiento de alto volumen

Se purificaron His₆-OTC y OTC-His₆ a partir de células BL21 cotransformadas con pGroEL/ES y pLIC-HuOTC o pOPINE-HuOTC respectivamente. La sobreexpresión de la OTC humana y la sonicación de las células que la contenían se realizó en las mismas condiciones descritas para la proteína sin etiqueta (sección 3.6.1.), así como el filtrado del sobrenadante de la centrifugación postsonicación. Este sobrenadante filtrado se cargó utilizando una bomba peristáltica en dos columnas consecutivas (en serie) His-trap de 1 ml (GE Healthcare) equilibradas con una solución de trietanolamina 10 mM pH 8, EDTA 1 mM, imidazol 20 mM, conectando a continuación dichas columnas, en serie, en un cromatógrafo FPLC AKTA, lavándolas a una velocidad de flujo de 1 ml/min en el mismo tampón hasta que la Abs²⁶⁰ del efluente alcanzó un nivel bajo y estable, aplicando luego un gradiente lineal de 20 ml entre 20 y 500 mM imidazol en el mismo tampón de equilibrio de la columna. El imidazol, al competir con las histidinas de la etiqueta (la histidina tiene en su cadena lateral un anillo imidazólico), desplaza a la etiqueta de su unión al níquel a una concentración determinada de imidazol. Se recogieron fracciones del eluido y se analizaron mediante SDS-PAGE. Las fracciones que contenían la proteína se juntaron y concentraron mediante ultrafiltración centrífuga (dispositivo Amicon[®] Ultra – 15 con membrana de corte nominal, 30 kDa), realizando además varios ciclos de dilución y reconcentración en el mismo tampón sin imidazol. Por último, la concentración de proteína se cuantificó mediante la técnica Bradford y su pureza se determinó a partir de un gel SDS-PAGE al 12 % en el que se cargaron 3 µg de la proteína purificada. Las proteínas purificadas se suplementaron con glicerol a concentración final 20 % y se guardaron en alícuotas a -80° C.

- Prueba piloto de purificación rápida antes y después de escisión de la etiqueta

Durante este trabajo, se ha probado un método rápido para purificar OTC con etiqueta de polihistidinas a partir de 20 ml de cultivo preparado como se ha indicado previamente, resuspendiendo en 1.2 ml de tampón de lisis y sonicando con la sonda exponencial de 3 mm (Exponential Titanium Microprobe) con 10 pulsos de 15 s y descansos de 1 min entre cada dos pulsos. El sobrenadante del extracto celular centrifugado se sometió a cromatografía de afinidad rápida usando una columna de purificación His Spin-Trap (de GE Healthcare) siguiendo el protocolo del fabricante, en el que la columna se equilibra con 600 µl de tampón usado en la fase inicial de la purificación por FPLC, luego se aplica la muestra hasta 600 µl, seguido de un lavado de igual volumen y de elución de OTC etiquetada mediante elución con 400 µl (dos lotes de 200 µl) del mismo tampón suplementado con 0.5 M de imidazol.

La OTC, expresada a partir de la construcción pLIC-HuOTC, aislada de este modo y concentrada a 1 mg/ml (eliminando el imidazol en el proceso de concentración por ultrafiltración centrífuga), se incubó a 15 °C durante 3 horas con 75 µg/ml de proteasa TEV en trietanolamina 10 mM, EDTA 0.5 M, MSH 5 mM. Corroborada la digestión, se purificó la proteína sin etiqueta mediante un nuevo pase por la columna His Spin-Trap debidamente regenerada (ver sección de resultados). Este mismo procedimiento se utilizó también de forma piloto con éxito, con la proteína purificada por FPLC.

3.7. Ensayos de actividad y parámetros cinéticos

3.7.1. Ensayo estándar de actividad enzimática

En la reacción catalizada por la OTC (ver introducción) se produce citrulina como producto, la cual es detectable colorimétricamente por su carácter ureídico, en reacción con el reactivo A+B (A: Antipirina 0.02 M, sulfato amónico-férrico (III) 0.005 M, H₂SO₄ concentrado al 25 % y H₃PO₄ concentrado al 25 %, B: 2-3 Butanodiona 0.40 % y NaCl 7.5 %). En el ensayo, de punto final, se incubó el enzima (generalmente 2-25 ng) durante 10 min en 75 µl de solución a 37 °C que contiene ornitina 2.5 mM y 5mM carbamil fosfato en trietanolamina 0.27 M pH 7.7. La reacción se detiene con 75 µl de ácido tricloroacético al 10 %. El desarrollo de color se obtuvo incubando las muestras en un baño a 95 °C en oscuridad durante 15 min después de haberles añadido 800 µl de reactivo A+B en las proporciones 2:1. Tras atemperar las muestras (15 min en oscuridad) se midió la absorbancia a 464 nm en cada una de ellas, usando un espectrofotómetro Ultrospec 2000 de Pharma Biotech y cubetas de plástico de 1 ml, determinando la citrulina producida por interpolación en una curva patrón para esta sustancia.

3.7.2. Ensayos de parámetros cinéticos de ornitina y carbamil fosfato

Para determinar los parámetros cinéticos tanto para la ornitina como para el carbamil fosfato, se realizaron ensayos, con 3 ng de enzima, en idénticas condiciones que las descritas en el apartado 3.7.1., variando independientemente la concentración de uno u otro sustrato, manteniendo fija la concentración del otro al nivel presente en el ensayo estándar.

3.8. Otros métodos

Los análisis electroforéticos de proteínas se realizaron de acuerdo con la metodología de SDS-PAGE desarrollada por Laemmli (1970). Para analizar muestras con elevada concentración salina, como en las fases de precipitación con sulfato amónico, se eliminaron dichas sales por gel filtración centrífuga (Penefsky, 1977) en jeringas de insulina desechables de 1 ml conteniendo Sephadex G25 medium equilibrada con Tris 50 mM pH 7.4 y centrifugada 2 min en posición 4 de una centrífuga IEC CLINICAL CENTRIFUGE (42901435). Se aplican hasta 100 µl de la muestra a desalar, volviendo a centrifugar y recogiendo el eluido, que contiene la proteína desalada. La cuantificación de proteínas se realizó por la técnica de Bradford (1977), utilizando un reactivo comercial (Bio-Rad) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Para métodos generales, ver anexo.

4.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El procedimiento convencional de purificación de OTC recombinante usado en el laboratorio es un procedimiento largo y tedioso que implica varias etapas y requiere varios días. Por ello, nos propusimos poner a punto un procedimiento alternativo más sencillo de producción de OTC recombinante. Como ya se ha indicado anteriormente, nos planteamos dos alternativas (Fig. 6): la producción de una forma de OTC que introdujera la His₆ en el extremo N-terminal (His₆-OTC) y otra que la introdujera en el extremo C-terminal (OTC-His₆), con el propósito de que alguna de las construcciones permitiera la expresión de una forma soluble de la OTC que pudiera purificarse por cromatografía de afinidad a columna de níquel.

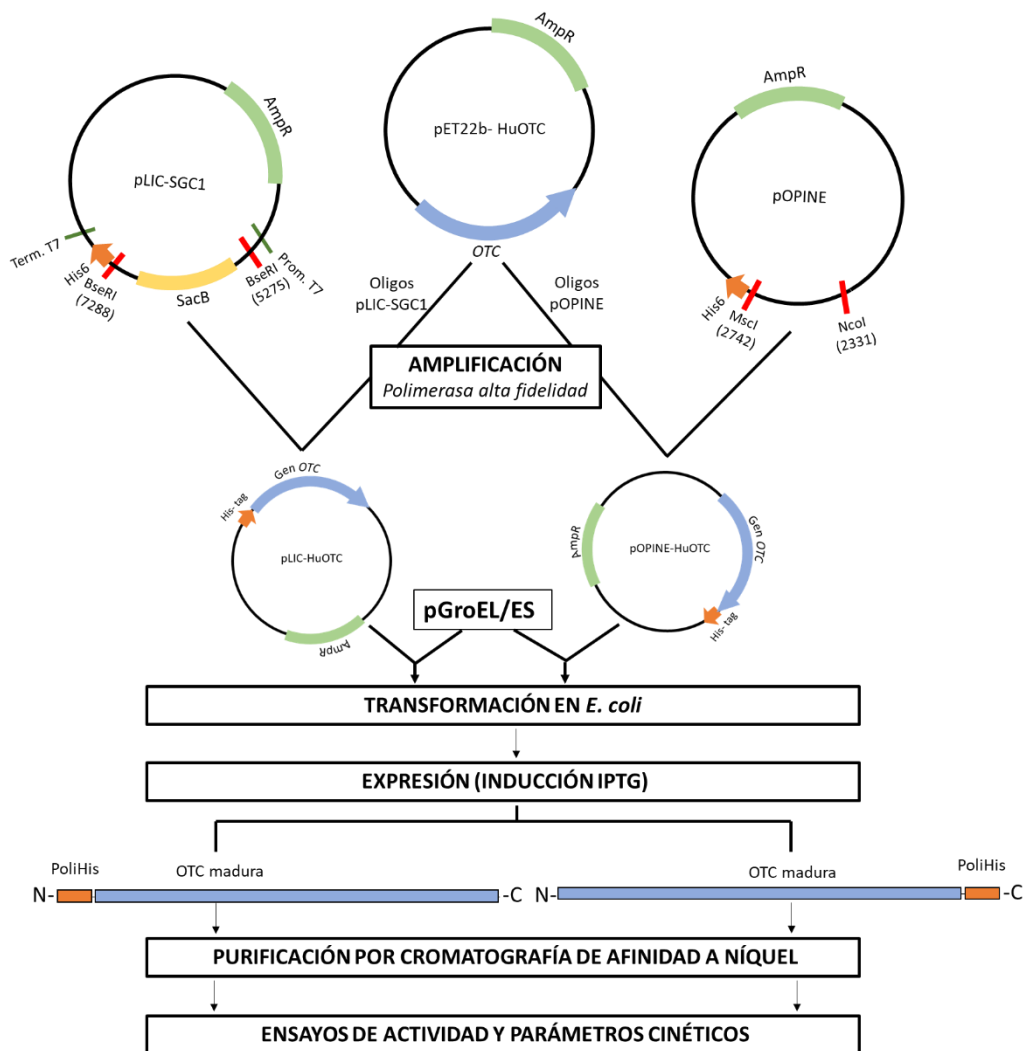


Figura 6. Esquema general de las dos estrategias seguidas para la producción de His₆-OTC y OTC-His₆. Se indican las principales etapas del procedimiento experimental de ambas estrategias, así como esquemas de las construcciones generadas y de las proteínas producidas.

4.1. Clonaciones

Tras secuenciar el plásmido pET22b-HuOTC, previamente generado en el laboratorio, y comprobar que este contenía la secuencia correcta del gen *OTC*, codificante para la OTC, el primer objetivo fue subclonar esta región en dos vectores diferentes, pLIC-SGC1 y pOPINE. Cada uno de estos plásmidos permite introducir la etiqueta la His₆ en un extremo distinto de la

proteína (Fig. 6). Así, pLIC-SGC1 está diseñado para introducir dicha etiqueta en el extremo N-terminal y pOPINE en el extremo C-terminal. Puesto que ambos plásmidos estaban disponibles en el laboratorio, decidimos intentar ambas aproximaciones, pues a priori no se sabía cómo afectaría en el plegamiento y la actividad de la proteína la introducción de His₆ en un extremo u otro.

4.1.1. Clonación en pLIC-SGC1

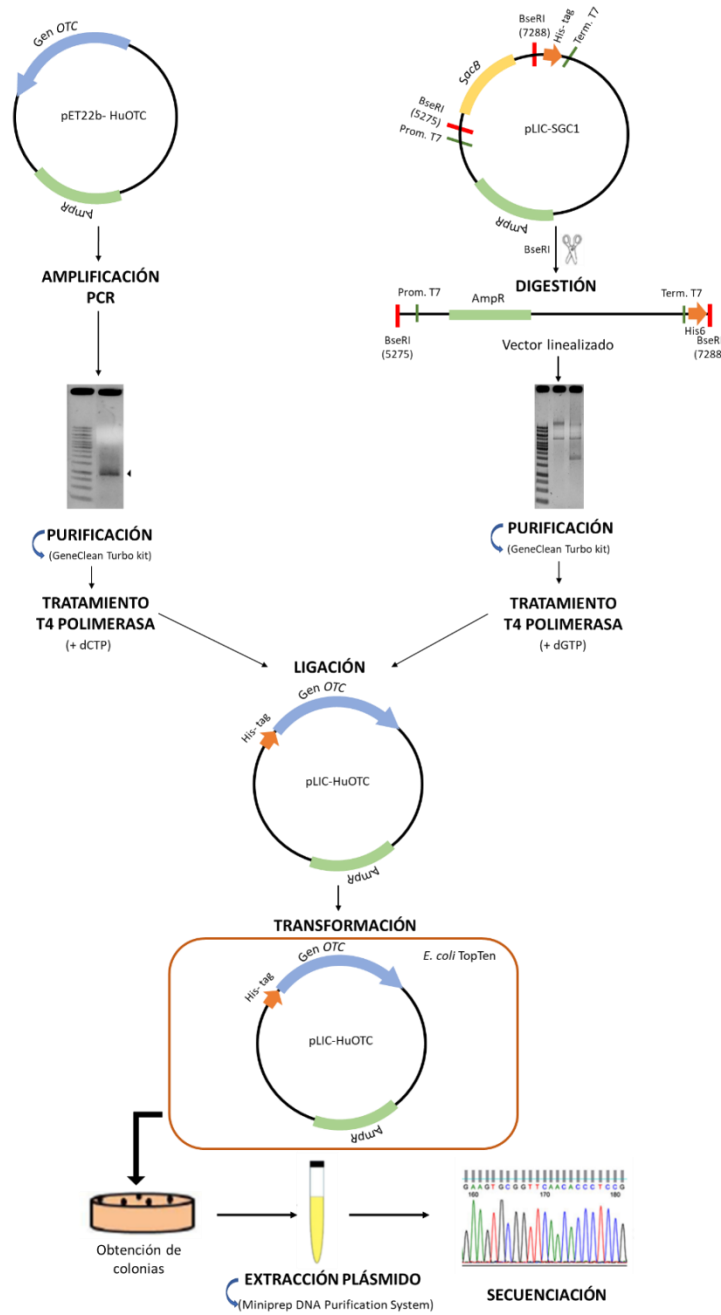


Figura 7. Esquema general de la clonación en pLIC-SGC1.

La preparación de pLIC-HuOTC, utilizada para producir His₆-OTC se realizó siguiendo la estrategia que se muestra en la Fig. 7. Para ello, se clonó el gen OTC en el plásmido de expresión pLIC-SGC1, siguiendo las recomendaciones para clonación en este vector, que es un procedimiento independiente de ligasa (LIC, por sus siglas en inglés). El procedimiento se basa en la generación

de extremos de cadena simple complementarios en el inserto y en el vector, utilizando para ello la actividad exonucleasa de la polimerasa T4 y su posterior hibridación (HELMHOLTZ-MUENCHEN, 1992). Por ello, he preparado y tratado el vector (pLIC-SGC1) y el inserto (*OTC*) por separado para su posterior ligación.

Para la amplificación del inserto, se partió de la construcción pET22b-HuOTC que tiene clonado el gen *OTC*. Para ello, diseñé cebadores pLIC-HuOTC directo y reverso (Tabla 1) que incluyen en sus extremos 5' regiones de extra de 20 y 19 nucleótidos que no corresponden a las secuencias flanqueantes de *OTC* en pET22-HuOTC sino a las regiones que indica el protocolo de clonación en pLIC-SGC1 (Addgene), que han de incluirse en los cebadores, para generar en el amplificado los extremos adecuados para su clonación en este plásmido (Fig. 7). El análisis electroforético del producto de PCR mostró, que a diferencia de en el control negativo, en el que no se observaba amplificación, en la muestra en la que se puso como molde pET22-HuOTC, se observaba una banda de aproximadamente 1000 pb, tal y como se esperaba para la región codificante para la *OTC* (Fig. 8A).

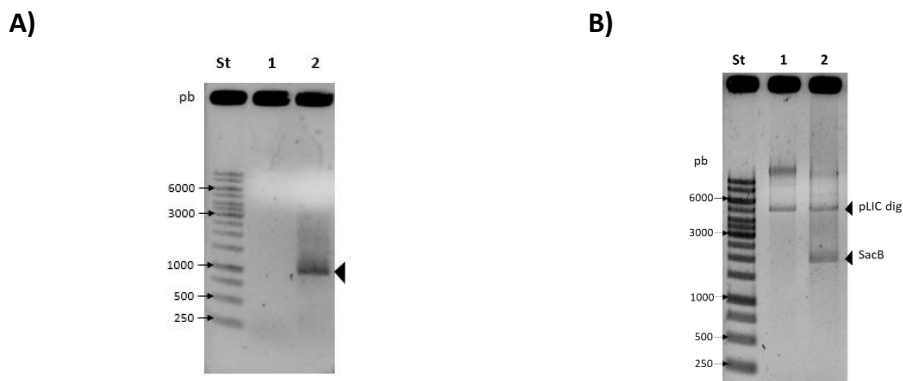
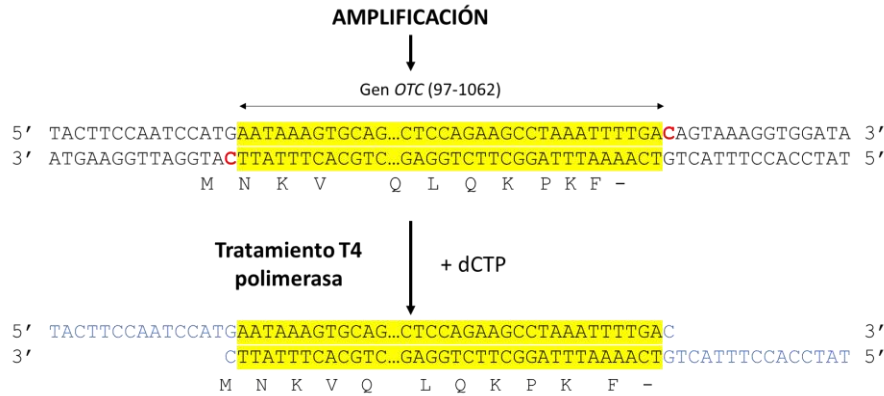


Figura 8. Análisis electroforético de la amplificación y digestión de pLIC-SGC1. Ambos paneles ilustran electroforéticamente en agarosa al 1" teñidas con GelRed. La banda St corresponde en ambos casos a marcadores de DNA O`GeneRuer 1 kb DNA Ladder, con indicación de algunas masas guía en el margen junto al carril. **A)** Amplificación de la porción codificante de la *OTC* madura, usando cebadores específicos para clonación en pLIC-SGC1, siendo el carril 1 el control negativo sin molde y el 2 el positivo con DNA molde. La punta de flecha marca la banda correspondiente al amplificado deseado. **B)** Plásmido de pLIC-SGC1 antes (carril 1) y después (carril 2) de su digestión con BseRI. Las puntas de flecha indican las bandas correspondientes al vector linealizado y el gen *SacB*.

En la miniprep realizada (ver anexo) para la extracción de pLIC-SGC1, se obtuvo el vector a una concentración de 182.2 ng/μl. El análisis electroforético de la digestión de pLIC-SGC1 con BseRI, confirmó la linealización del mismo (Fig. 8B). BseRI digiere en las posiciones 5275pb y 7288 pb del vector, escindiendo así la región correspondiente al gen *SacB* (2013 pb) (Fig. 8B), del resto del vector (5492 pb) que fue purificado para seguir el procedimiento de clonación en el mismo. Se puede observar en la Fig. 8B que el plásmido sin digerir (carril 1) muestra bandas de diferentes tamaños que corresponden a los diferentes grados de superenrollamiento del plásmido circularizado. En la muestra digerida también se observó una banda de menor migración (parte superior), que correspondería con el vector no digerido y que por tanto indica que la digestión del mismo fue parcial. Las purificaciones del vector linealizado y el inserto dieron preparaciones a 8.2 ng/μl y 36.0 ng/μl, respectivamente. Estas preparaciones fueron tratadas con T4 polimerasa en presencia de dCTP en el caso del vector y dGTP en el caso del inserto, para crear extremos complementarios adecuados para la ligación de ambos. La actividad exonucleasa de la T4 polimerasa, elimina nucleótidos del extremo 3' hasta encontrar una G cuando hay dCTP o

una C cuando hay dGTP generando así para vector e inserto extremos de cadena simple complementarios. La adición de dCTP o dGTP al medio de reacción de T4 polimerasa tiene como consecuencia la detención de la actividad exonucleasa de la misma cuando se alcance la primera G o C, respectivamente (Fig. 9).

A) Inserto:



B) Vector:

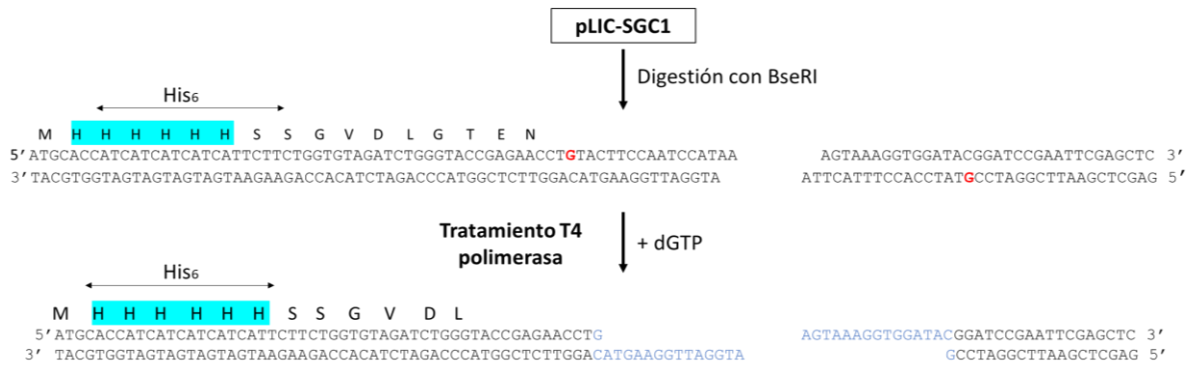


Figura 9. Extremos del inserto (OTC) y el vector (pLIC-SGC1) antes y tras su tratamiento con T4 polimerasa. La región resaltada en amarillo corresponde a las regiones flanqueantes del gen OTC y las secuencias no resaltadas en el inserto corresponden a las secuencias añadidas en los cebadores diseñados para clonar con tecnología LIC. Se marca en azul la extensión de polihistidinas del plásmido (pLIC-SGC1) linealizado, en rojo se marca el punto en el que la polimerasa se separa del DNA y cesa su actividad exonucleasa.

En la reacción de ligación, inicialmente se probaron varias proporciones plásmido: inserto. Dado que la muestra del vector estaba muy diluida, esto supuso el uso de volúmenes grandes en la transformación, en la cual no se obtuvieron transformantes. No valoramos la viabilidad de las células tras la transformación, pero pensamos en la posibilidad de que esta se viera afectada por el elevado volumen de muestra empleado en la transformación. Al repetir la ligación, con un volumen inferior de muestra y proporción plásmido: inserto 5:1, sí obtuve colonias transformantes, a partir de las cuales continué el procedimiento experimental. La selección de transformantes se realizó como se muestra en Fig. 10. A partir de colonias aisladas crecidas tras la transformación se hicieron reacciones de PCR utilizando cebadores que hibridan en las zonas de pLIC-SGC1 que flanquean al inserto de OTC, de manera que se esperaba que en caso de que OTC se hubiera insertado correctamente en el vector, se observaría un amplificado de aproximadamente 1000 pb que no debería observarse para pLIC-SGC1 sin inserto.

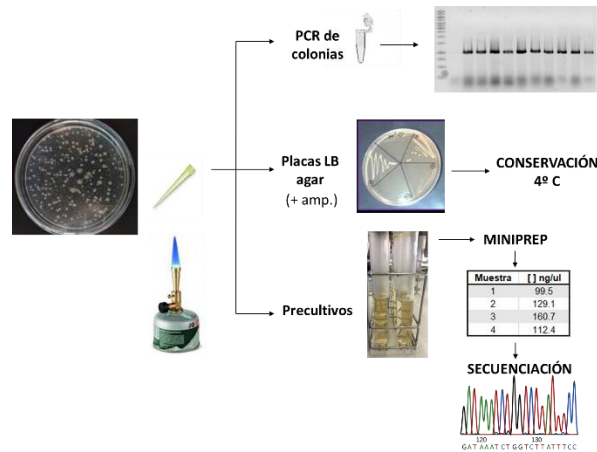


Figura 10. Esquema de la preparación de la PCR a partir de colonias y precultivos para realizar la extracción de los plásmidos transformados.

Como se muestra en la Fig. 12, en todas las colonias seleccionadas (10 en total) se obtuvo la amplificación del tamaño esperado para *OTC* (Fig. 12, muestras 1-10), que no se observó en el control negativo, al cual no se añadió DNA molde (Fig. 12, pocillo CN). Para corroborar que la construcción era correcta y que la región clonada carecía de mutaciones, se extrajo DNA plasmídico a partir de cultivos crecidos de 4 de las colonias mencionadas anteriormente que se secuenciaron con cebadores adecuados para obtener secuencias de todo el inserto. Se consiguió confirmar la secuencia correcta de todo el inserto en 2 de las mismas y se continuó con una (99.5 ng/μl) de estas para las siguientes etapas experimentales.

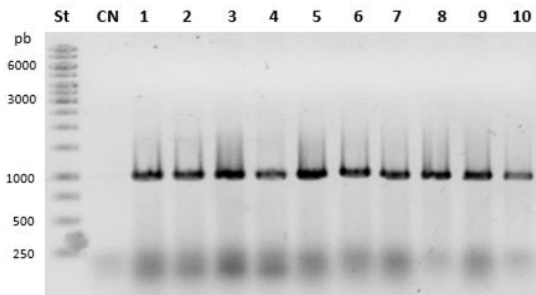


Figura 11. Análisis electroforético de la PCR para selección de transformantes de pLIC-HuOTC. St, escala de ADNs patrón de masas conocidas (O'GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder); CN, control negativo en el que no se inoculó ninguna colonia. 1-10, amplificados correspondientes a las colonias seleccionadas.

4.1.2. Clonación en pOPINE

La preparación de pOPINE-HuOTC, utilizada para producir OTC-His₆ se realizó siguiendo la estrategia que se muestra en la Fig. 12. En este procedimiento se utilizó la tecnología In-fusion (Clontech) para clonación sin ligación (TAKARA BIO GROUP, 2018). Al igual que se ha explicado anteriormente para la clonación en pLIC-SGC1, fue necesario amplificar *OTC* usando cebadores que incluían regiones de aproximadamente 15 nucleótidos no específicas del gen, sino determinadas por la secuencia del sitio de inserción en pOPINE (Addgene, Fig. 12), que quedan flanqueando el gen amplificado. El plásmido fue digerido con los enzimas de restricción NcoI y MscI, que dejan muy cerca de los sitios de corte regiones equivalentes a las introducidas en los extremos del inserto. De este modo, y siguiendo las especificaciones para clonar en POPINE y usando la mezcla de enzimas In-fusion, se obtuvo pOPINE-HuOTC (Fig. 12).

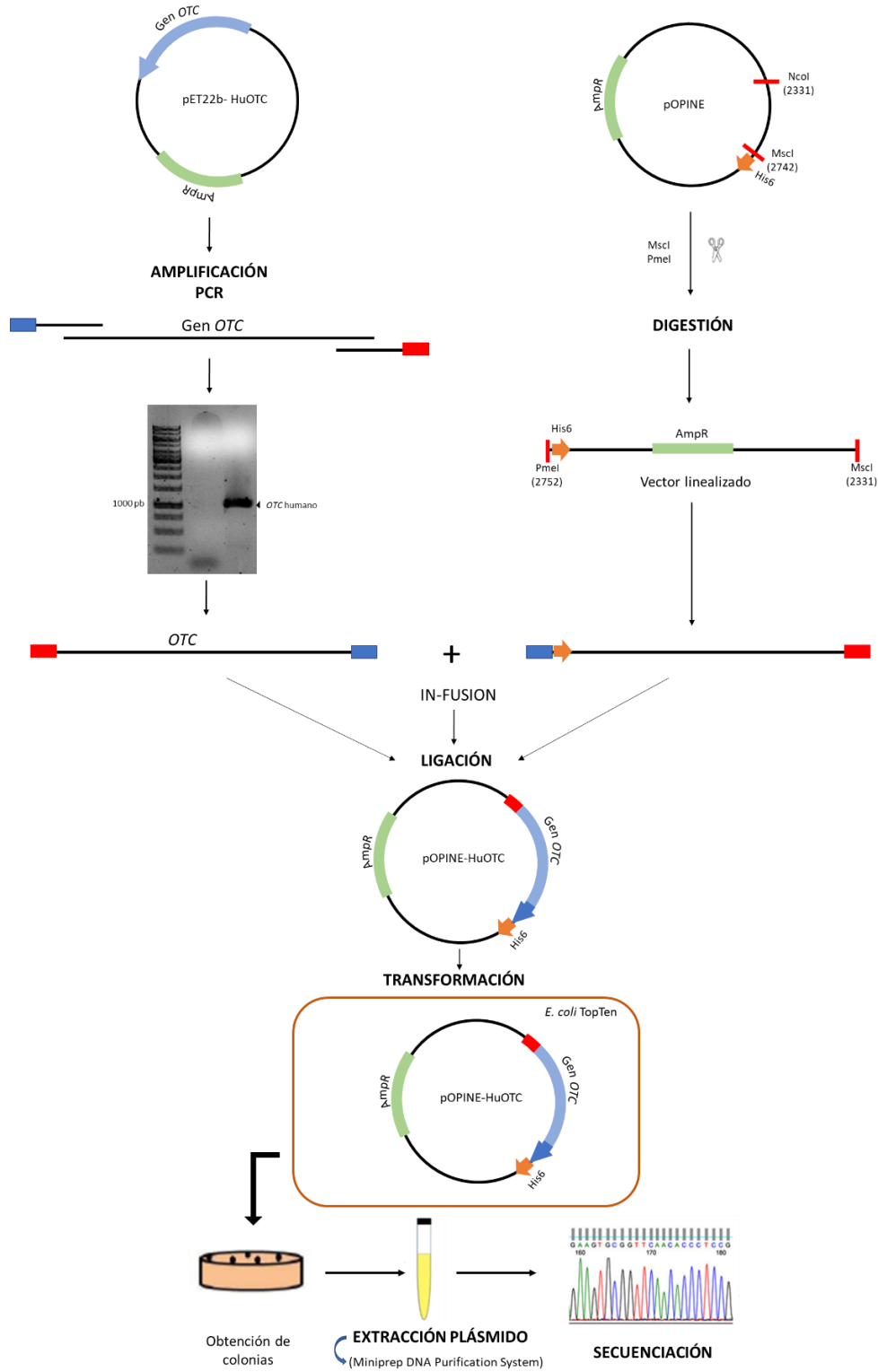


Figura 12. Esquema general de la clonación en pOPINE.

La amplificación del gen *OTC* se comprobó realizando un gel de agarosa al 1% (Fig. 13), en el que se observó la presencia de una banda de tamaño aproximado de 1000 pb que no se observaba en el control negativo y que correspondía con el tamaño esperado para el gen *OTC*.

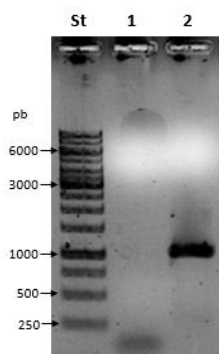


Figura 13. Análisis electroforético de la amplificación del gen OTC para clonación en pOPINE. Se muestra el gel de agarosa al 1% que se realizó para comprobar la amplificación del gen OTC. St, marcador de peso molecular (O'GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder), 1, control negativo y 2, amplificado del gen OTC, marcado con cabeza de flecha.

A diferencia de lo que he explicado en la clonación en pLIC-SGC1, para la inserción de *OTC* en pOPINE, la ligación se probó sólo con una proporción plásmido:inserto, siguiendo lo que se había realizado con éxito en el laboratorio anteriormente. La razón para esto fue el elevado coste de la mezcla In-fusion. Afortunadamente esta proporción fue adecuada y permitió la obtención de colonias aisladas tras la transformación. Se escogieron 9 de estas colonias para, siguiendo un procedimiento similar al descrito en la sección 4.1.1., con la diferencia de que se usaron cebadores adecuados para pOPINE, comprobar la inserción de un fragmento de DNA del tamaño esperado para *OTC*. En todas las reacciones se observó un amplificado de este tamaño (Fig. 14), igual al obtenido a partir de pET22b-HuOTC, que se usó como molde del control positivo (CP, Fig. 14) y a diferencia de lo observado en el control negativo, carente de molde, en el que no se observó amplificación (Fig. 14).

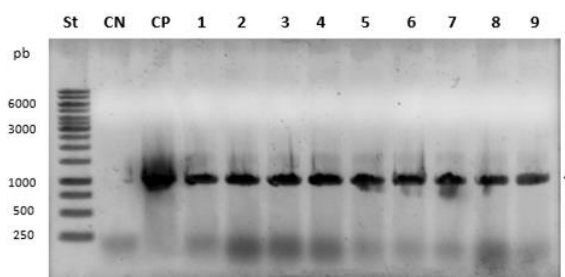


Figura 14. Análisis electroforético de la PCR a partir de colonias para selección de transformantes de pOPINE-HuOTC. St, marcador de peso molecular (O'GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder); CN, control negativo en el que no se inoculó ninguna colonia; CP, control positivo en el que se introdujo la construcción pET22b-HuOTC. 1-9, amplificados correspondientes a las colonias seleccionadas.

La correcta inserción de *OTC* en pOPINE-HuOTC, así como la ausencia de mutaciones, fue comprobada mediante secuenciación del DNA plasmídico obtenido a partir de algunas colonias seleccionadas. Una de estas muestras (113 ng/ μ l) se utilizó para sobreexpresar OTC-His₆, como se describe en el apartado siguiente.

4.2. Producción de OTC con etiquetas His₆

4.2.1. Producción de His₆-OTC

Para la expresión de la OTC con etiqueta de polihistidinas N-terminal (His₆-OTC, Fig. 16), se partió del plásmido pLIC-HuOTC obtenido como se explica en el apartado 4.1.1. Se utilizó para ello la

cepa BL21 (DE3), la misma cepa de *E. coli* en la que se expresaba la OTC sin etiqueta a partir de pET22b-HuOTC, pues al ser deficiente en proteasas, mejora la expresión de proteínas recombinantes. Puesto que la OTC sin etiqueta se coexpresaba junto a chaperoninas codificadas por el pGroEL/ES, se probó a expresar la His₆-OTC tanto en presencia como en ausencia de estas chaperoninas. Para ello, se partió tanto de células BL21 que contenían únicamente la construcción pLIC-HuOTC como de células que además se habían transformado con pGroEL/ES. En ambos casos se usaron condiciones de crecimiento a 25° C e inducción con bajo IPTG (0.01 mM) para favorecer el correcto plegamiento de las proteínas y como control se emplearon células que coexpresaban la OTC sin etiqueta y GroEL/ES.

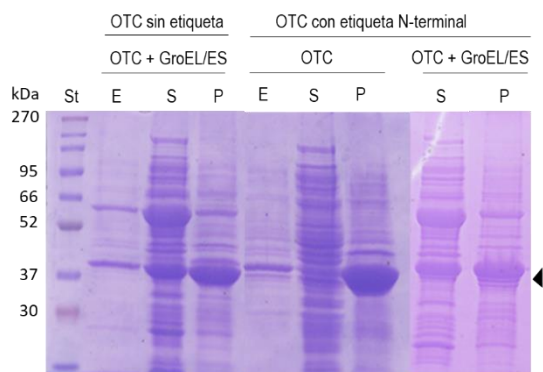


Figura 15. Análisis de la expresión y solubilidad de la OTC humana en cultivos de BL21 con pET22b-HuOTC + pGroEL/ES, pLIC-HuOTC y pLIC-HuOTC + pGroEL/ES. Imagen de una electroforesis SDS-PAGE al 12% teñida con azul Coomassie para analizar la solubilidad de la OTC producida a partir de distintas construcciones. Se muestra para cada construcción el extracto celular para analizar la expresión (Exp), la fracción soluble (S) y la fracción no soluble (P).

Antes y tras la inducción con IPTG, se extrajo una muestra del cultivo para evaluar la expresión de la OTC (Fig. 15) y estas células se lisaron para analizar la fracción soluble y no soluble, tanto de las células que se habían transformado con la construcción pLIC-HuOTC como las que se habían transformado con pET22B-HuOTC y pGroEL/ES, pues esta última se utilizó como control de la expresión y del proceso de sonicación. Al igual que se había observado con la expresión de OTC a partir de pET22b-HuOTC, la expresión de OTC a partir de pLIC-HuOTC requirió la coexpresión de las chaperoninas GroEL/ES para conseguir producir una parte de la OTC en forma soluble. Como se observa en la Fig. 15, la OTC expresada en células que únicamente se habían transformado pLIC-HuOTC era insoluble. Por ello, se repitió la prueba de expresión, esta vez cotransfectando las células tanto con pLIC-HuOTC como con pGroEL/ES.

De esta manera se consiguió que parte de OTC sobreexpresada quedara en el sobrenadante. Puesto que este resultado apoyaba que para producir OTC humana en *E. coli* de manera soluble es necesario coexpresar OTC junto a chaperoninas moleculares que favorezcan su correcto plegamiento, se decidió producir His₆-OTC a partir de células *E. coli* BL21 portadoras de pLIC-HuOTC y pGroEL/ES. La sobreexpresión de una banda de aproximadamente 60 kDa (Fig. 15), confirmó que en los ensayos de expresión, se sobreexpresaba, además de OTC, una de las chaperoninas codificadas por pGroEL/ES (60 kDa es la masa esperada para GroEL). La electroforesis realizada no permitió determinar la sobreexpresión de GroES, que tiene un peso molecular de 10 kDa aproximadamente.

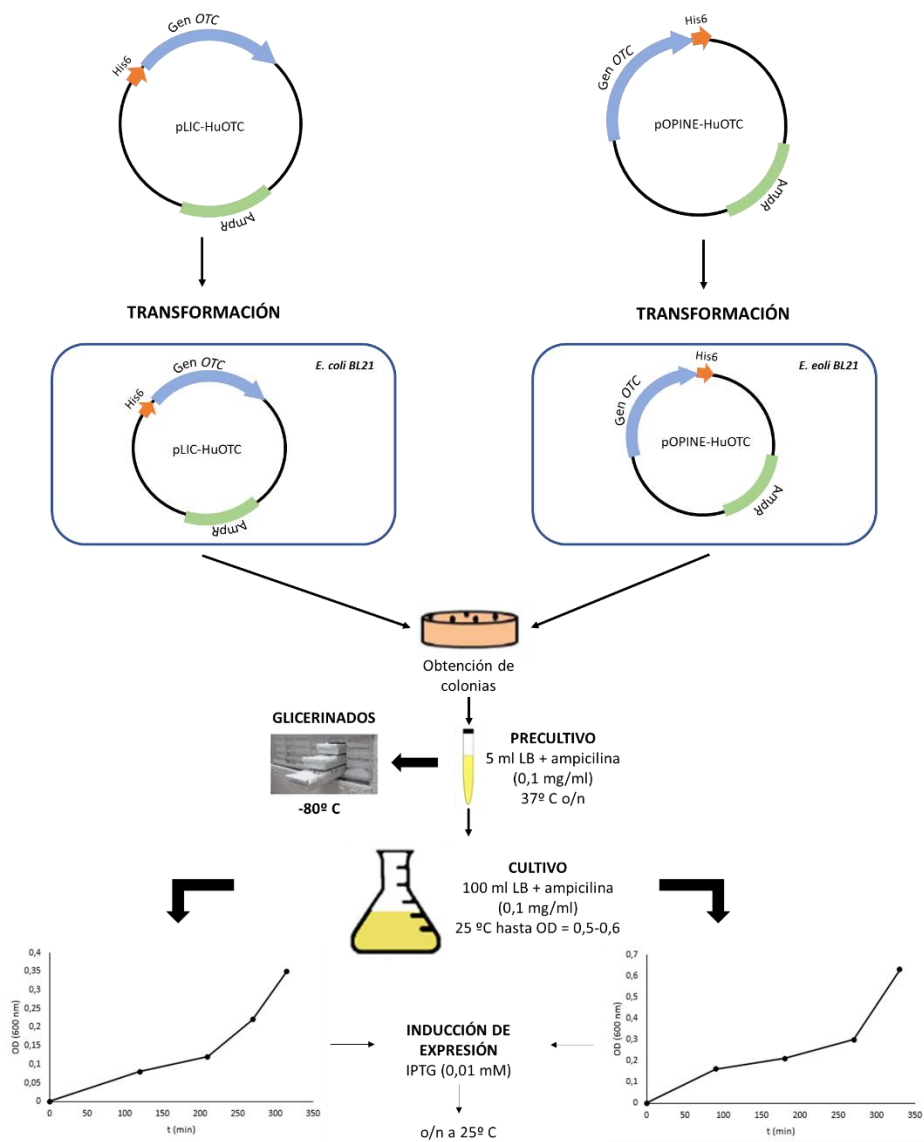


Figura 16. Esquema general del procedimiento de expresión de His₆-OTC y OTC-His₆. Por simplicidad no se ha incluido la cotransformación con pGroEL/ES.

4.2.2. Producción de OTC-His₆

Para expresar la OTC-His₆ se siguió la misma estrategia descrita en el apartado 4.2.1 (Fig. 16), analizando la expresión y solubilidad de OTC en células BL21 transformadas con pOPINE-HuOTC o con pOPINE-HuOTC y pGroEL/ES.

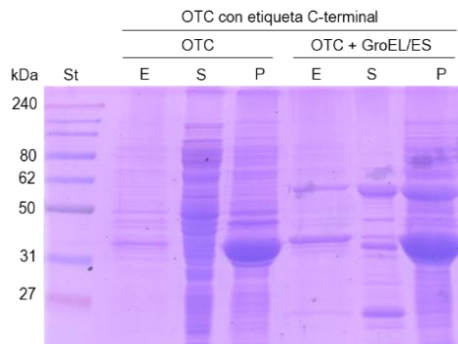


Figura 17. Análisis de la expresión y solubilidad de la OTC humana en cultivos de BL21 con pOPINE-HuOTC y pOPINE-HuOTC + pGroEL/ES. E, S y P indican células no fraccionadas, el sobrenadante y el precipitado obtenidos tras centrifugar los extractos celulares producidos por sonicación.

Como se observa en la Fig. 17, tras inducir la expresión de OTC en células que únicamente habían transformado pOPINE-HuOTC, toda la OTC producida se observa en la parte insoluble. Sin embargo, en células en las que se había cotransformado con pOPINE-HuOTC y pGroEL/ES se observó que una pequeña fracción de la OTC aparecía en el sobrenadante de la centrifugación del extracto celular.

Para confirmar la expresión de OTC se realizó una prueba de expresión en BL21 en ausencia y presencia de las construcciones pOPINE-HuOTC+pGroEL/ES o pLIC-HuOTC+ pGroEL/ES, analizando una muestra de cultivo cuando se alcanzó la fase exponencial de crecimiento y otra inmediatamente tras la inducción con IPTG (Fig. 18). Con esto se demostró que sólo tras la inducción con IPTG se observaba en el gel una proteína de aproximadamente 37 kDa, como se esperaba para la OTC, de esta manera se comprobó que BL21 no expresaba ninguna proteína endógena del tamaño de nuestra proteína y que por tanto la banda que observamos en las Fig. 15 y 17 corresponden a esta última.

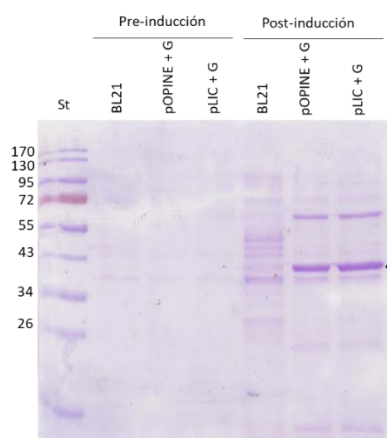


Figura 18. Comprobación de la sobreexpresión de OTC en BL21. Análisis electroforético en SDS-PAGE al 12% teñido con Coomassie para comprobar la correspondencia de la banda que se señala con cabeza de flecha con la OTC sobreexpresada. BL21, pOPINE+G y pLIC+G, muestras de BL21, BL21+ pOPINE-HuOTC+GroEL/ES y BL21+ pLIC-SGC1+GroEL/ES inmediatamente tras alcanzar la fase exponencial de crecimiento y antes de la inducción. En post-inducción, las mismas muestras tras inducir con IPTG (0.01 Mm).

4.3. Purificación de OTC recombinante

Puesto que las dos estrategias seguidas en este trabajo con etiqueta His₆, bien en el extremo N-terminal (His₆-OTC) bien en el extremo C-terminal (OTC-His₆) consiguieron producir proteína soluble, escalamos a volúmenes superiores de cultivo la expresión puesta a punto como se explica en los apartados anteriores, a un volumen mayor de cultivo. Además, produce la OTC sin etiquetas (a partir de la construcción pET22b-HuOTC) como se produce en el laboratorio habitualmente, para familiarizarme con el procedimiento y poder compararlo con los correspondientes a la obtención de His₆-OTC y OTC-His₆.

4.3.1. Purificación de OTC sin etiqueta

La purificación de la OTC carente de etiqueta de His₆ se realizó como se esquematiza en la Fig. 19, de acuerdo con el protocolo puesto a punto previamente en el laboratorio, partiendo de la



Figura 19. Esquema de las etapas de la purificación de la OTC sin etiqueta His₆. Sombreado en amarillo, se identifica en cada paso la fracción en la que queda la mayoría de OTC, mientras que las cruces rojas marcan las fracciones descartadas, en las que se van separando las impurezas.

fracción soluble de células BL21+ pET22b-HuOTC+ pGroEL/ES, obtenida siguiendo el mismo procedimiento descrito en apartados anteriores, y en la que la OTC representa algo menos del 20% del contenido proteico total (estimación densitométrica de genes teñidos con azul Coomassie, Fig. 20, 2º carril desde la izquierda, usando el programa FUJI FILM Multi Gauge Vers. 2.0, de Fuji). El paso de precipitación con sulfato de protamina tiene como finalidad eliminar ácidos nucleicos y no produce purificación sustancial de la OTC en términos de fracción de la proteína total representada por esta enzima en el sobrenadante de esta precipitación (Fig. 20). Se realizaron luego dos pasos de precipitación con sulfato amónico, a 1.64 M y a 3.6 M, en la primera de las cuales la OTC quedó en la fracción sobrenadante tras la centrifugación, y en la segunda en el precipitado (Fig. 20). Por último, el paso final de purificación, muy efectivo, fue el paso por una columna de intercambio de aniones de la preparación enzimática dializada frente a un tampón de baja fuerza iónica, columna que retiene los contaminantes y deja pasar la proteína especialmente pura (Fig. 21). Puede verse como se eluyen los contaminantes cuando se aplica un gradiente creciente de NaCl para regenerar la columna (Fig. 21: el gradiente se representa en verde). Más adelante, en la Fig. 25A, se ilustra la pureza de la preparación final de OTC sin etiqueta obtenida. Este procedimiento de purificación se repitió dos veces, obteniéndose un rendimiento medio de 47 ± 13 mg de proteína por litro de cultivo inicial (ver Fig. 24B, más adelante).

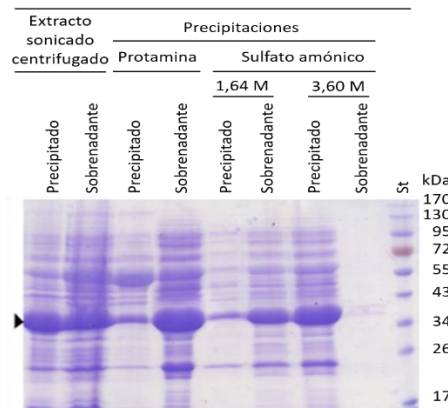


Figura 20. Análisis electroforético en un gel SDS-PAGE al 12% del sobrenadante y precipitado de las distintas etapas de la purificación de la OTC carente de etiqueta.

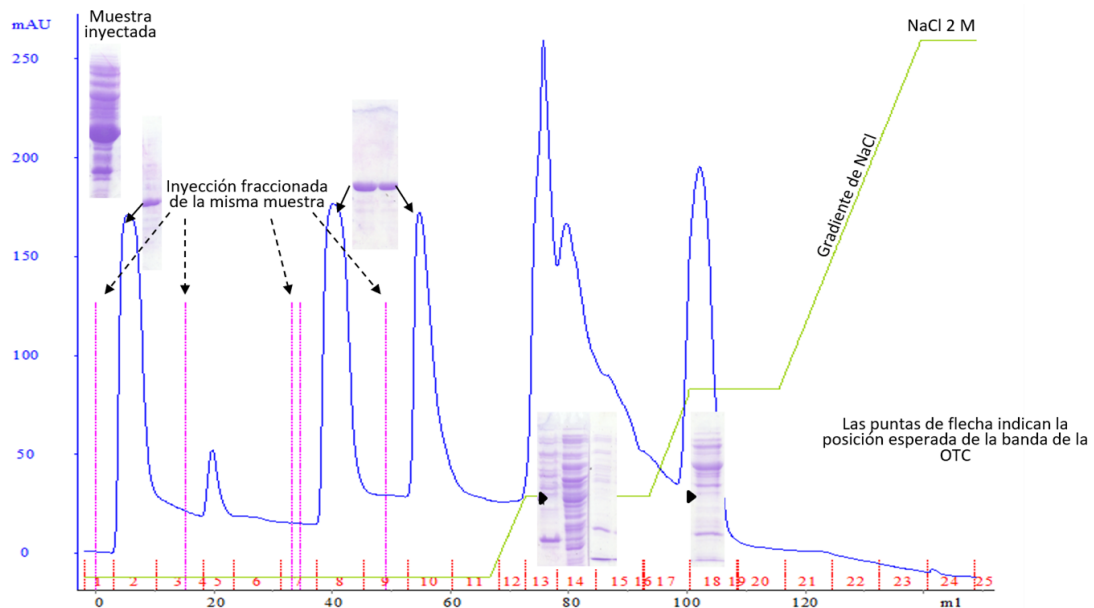


Figura 21. Cromatograma de purificación de la OTC humana recombinante sin etiqueta producida a partir de pET22-HuOTC con columna de intercambio iónico. El perfil de absorbancia a 280 nm se muestra en azul, la variación en la concentración de NaCl en verde, la inyección de muestra con líneas discontinuas verticales en rosa y las distintas fracciones están separadas con líneas rojas. Se muestra el análisis en SDS-PAGE de la muestra inyectada (muestra dializada), así como de las fracciones no retenidas, donde se localiza la banda correspondiente a OTC, y de fracciones seleccionadas obtenidas tras el incremento de la concentración de NaCl.

4.3.2. Purificación de His₆-OTC y OTC-His₆ en un solo paso de afinidad a Ni²⁺

Ambas formas de OTC con etiqueta de His₆ se purificaron por cromatografía de afinidad a columna de níquel de 1 ml en un sistema de FPLC, usando como material de partida la fracción soluble de los extractos celulares correspondientes, utilizando procedimientos equivalentes.

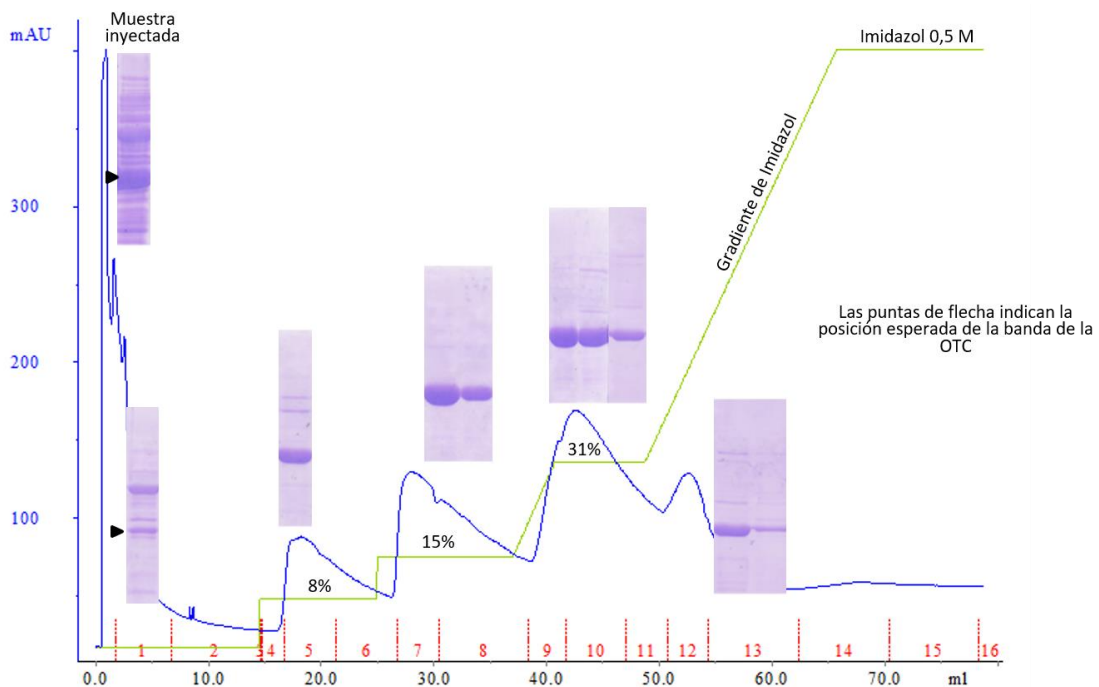


Figura 22. Cromatograma correspondiente a la purificación de His₆-OTC con columna de níquel. Se muestra azul el perfil de absorbancia a 280 nm, en verde el incremento en la concentración de imidazol y las distintas fracciones separadas con líneas rojas. Se muestran en SDS-PAGE las fracciones seleccionadas, correspondientes a cada uno de los picos, para evaluar la pureza de OTC en las mismas.

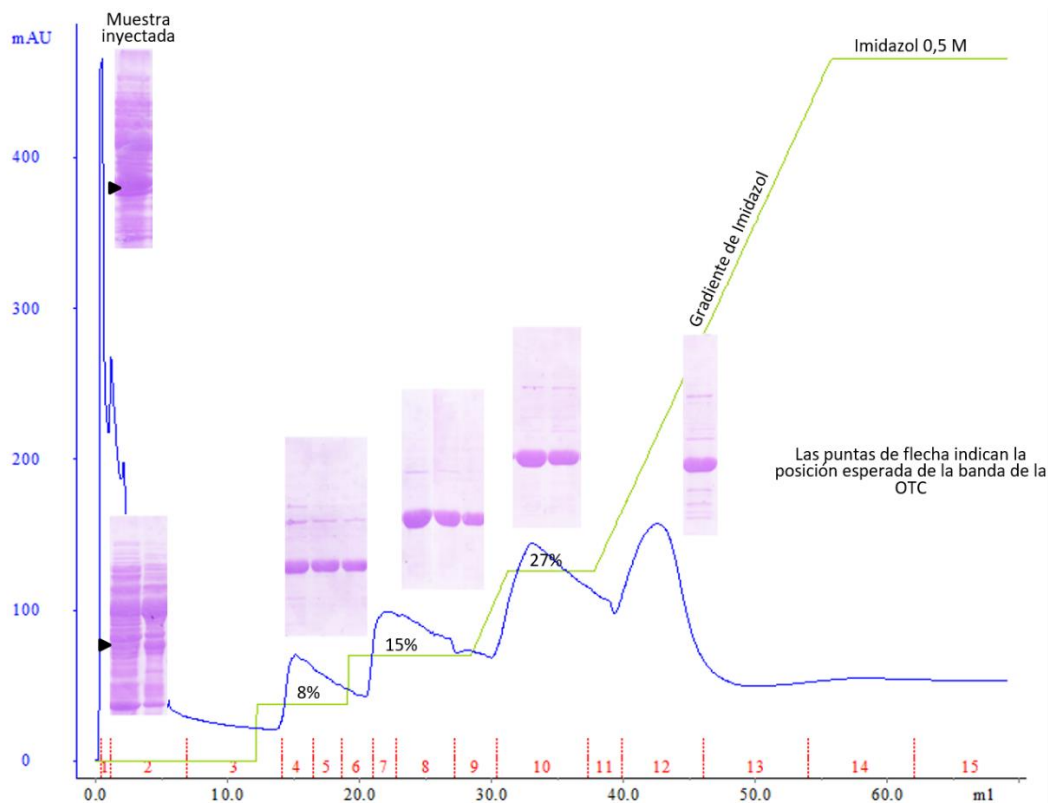


Figura 23. Cromatograma correspondiente a la purificación de OTC-His₆ con columna de níquel. Se muestra azul el perfil de absorbancia a 280 nm, en verde el incremento en la concentración de imidazol y las distintas fracciones separadas con líneas rojas. Se muestran en SDS-PAGE las fracciones seleccionadas, correspondientes a cada uno de los picos, para evaluar la pureza de OTC en las mismas.

Dado que ambas proteínas presentaban la etiqueta His₆ en un extremo u otro se esperaba que estas quedaran retenidas en la columna mientras que resto de proteínas de la muestra eluyeran de la misma durante el lavado. Efectivamente así fue, pues tanto en la fracción no retenida como en el lavado se observó mucha menos OTC que en la muestra inyectada, y la OTC se eluyó cuando se incrementó la concentración de imidazol ya que este compite con los grupos imidazol de las histidinas unidas al níquel. Así, tanto His₆-OTC como OTC-His₆, eluyeron de la columna de níquel a partir de 40 mM de imidazol (8% 0.5 M), obteniéndose las fracciones más puras, virtualmente libres de contaminantes (monitoreado electroforéticamente) al doble y triple de esa concentración de imidazol (Figs. 22 y 23), con una pureza similar a la de la OTC sin etiqueta (ver sección anterior), pero con un protocolo de purificación en un solo paso, y, por tanto, mucho más sencillo.

Tras el análisis electroforético, se juntaron aquellas fracciones que presentaban la OTC más pura y se concentraron. Para tener una muestra de proteína comparable a la proteína producida en ausencia de etiqueta, y también para evitar posibles efectos del imidazol sobre su actividad se incluyó un paso de cambio de tampón (ver Materiales y Métodos). Se repitió este procedimiento de purificación tres veces, y los resultados de pureza fueron muy consistentes (Fig. 24A). Los rendimientos medios fueron 111 ± 30 y 82 ± 14 mg de proteína por litro de cultivo en la producción de His₆-OTC u OTC-His₆, respectivamente (Fig. 24B). Estos rendimientos son superiores a los obtenidos cuando se expresó la forma sin etiqueta.

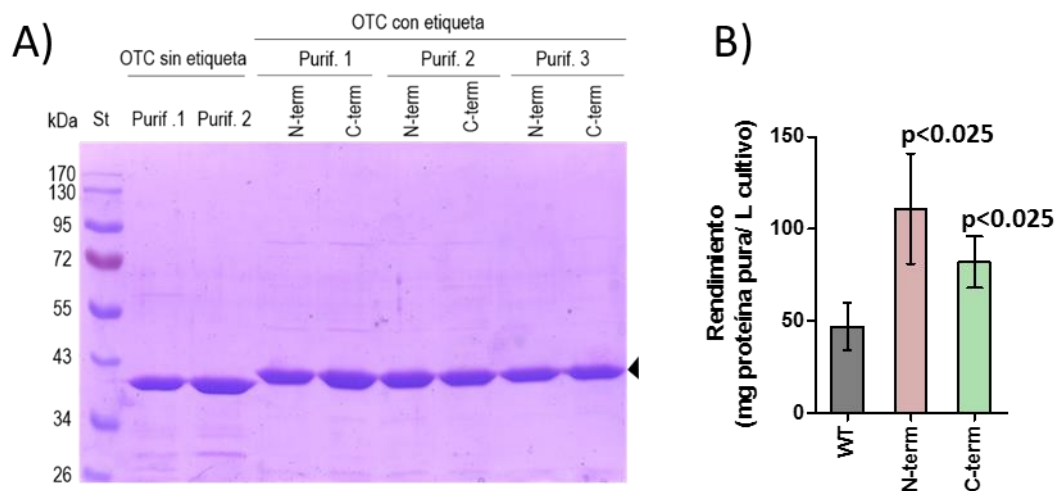


Figura 24. Análisis electroforético SDS-PAGE de la pureza y del rendimiento de las formas de OTC producidas sin etiqueta de His₆ N-terminal o C-terminal. **A)** Análisis electroforético de la OTC recombinante producida en todas las purificaciones realizadas (estándars de masa molecular en carril de la izquierda, marcado con St). Nótese que la migración de las formas con etiqueta es algo más lenta que la forma sin etiqueta, reflejando el aumento de masa debido a la presencia de los aminoácidos de la etiqueta. **B)** El rendimiento obtenido fue mayor para la purificación de las formas etiquetadas (valores de p obtenidos mediante comparación con la forma no etiquetada usando la t-student).

4.4. Ensayos de actividad

Producidas las tres formas de OTC descritas, la forma sin etiqueta, la forma His₆-OTC y la forma OTC-His₆ se llevaron a cabo ensayos de actividad enzimática con cada una de ellas usando el ensayo estándar descrito en Materiales y Métodos. La Fig. 25A muestra los resultados de un ensayo ilustrativo de los muchos realizados. En ella se representa para ese ensayo las absorbancias obtenidas en la determinación colorimétrica de la citrulina producida tras 10 minutos de incubación de las cantidades indicadas de cada forma de enzima con 2.5 mM ornitina y 5 mM de carbamil fosfato. Se observa que el ensayo es lineal con la concentración de cada enzima. Las pendientes de las tres líneas representan la dependencia de la producción de citrulina respecto a la concentración de cada forma de enzima. Es evidente que las pendientes son distintas, siendo la mayor la de la forma sin etiqueta. La Fig. 25B representa los valores medios de las medidas de actividad para todos los ensayos realizados con las distintas purificaciones de cada forma de enzima, expresando los valores como actividad específica en unidades por mg de proteína. Claramente las actividades son significativamente e importantemente más bajas para las formas con etiqueta que para la forma no etiquetada. Estos resultados fueron decepcionantes, pues indicaban que, aunque habíamos conseguido una excelente purificación en un solo paso con un rendimiento muy bueno, de al menos del doble del rendimiento de la forma sin etiqueta, los productos proteicos obtenidos tenían actividad subóptima, posiblemente reflejando un efecto negativo de las etiquetas sobre la actividad del enzima, fueran estas colocadas en N-terminal o en C-terminal. Los experimentos subsiguientes buscaron aclarar si esta baja actividad era consecuencia de la etiqueta, la vez que exploraban de forma piloto si era posible una purificación rápida de una forma producida con etiqueta, de la que se eliminara la etiqueta y recuperara plenamente su actividad.

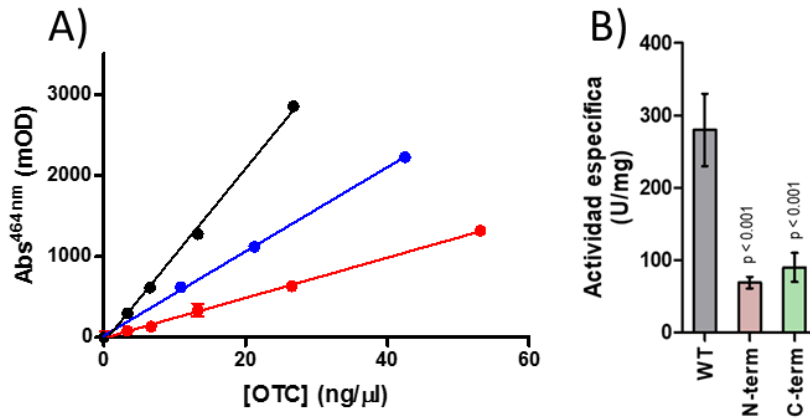


Figura 25. Actividad de las formas de OTC sin etiqueta o con etiqueta N- o C-terminal. **A)** Representación de la absorbancia en el ensayo colorimétrico de la citrulina producida en el ensayo estándar, para cantidades crecientes de proteína enzimática no etiquetada o con una u otra etiqueta. **B)** Resumen de los resultados de actividad para el promedio de repeticiones de los ensayos con las diferentes preparaciones generadas (ver la Fig. 25 para la pureza de dichas preparaciones). Los valores de p reflejan la significación estadística (t-Student) de la diferencia entre las medias de las formas etiquetadas respecto a la no etiquetada.

4.5. La digestión de His₆ N-terminal con proteasa TEV recupera la actividad plena de la OTC

En el producto de pLIC-HuOTC, His₆-OTC, hay un sitio de corte para la proteasa TEV entre la etiqueta de polihistidinas y la OTC. Lo aprovechamos para probar que la fusión con la etiqueta es causante de la baja actividad de las formas etiquetadas. Escindimos la etiqueta mediante digestión con proteasa TEV (prueba de hasta 5 horas, Fig. 26A; adoptamos 3 horas). La Fig. 26B prueba que la escisión elimina la etiqueta de poli-His, pues la OTC no se retiene por columna de Ni²⁺; y la 26C que con ello se restaura la actividad original de la forma sin etiqueta, abriendo el camino a la purificación de la forma sin etiqueta tras adición de un paso de digestión y de otro rápido de separación por afinidad de la forma etiquetada residual (retenida por la columna) y de la no etiquetada (no retenida).

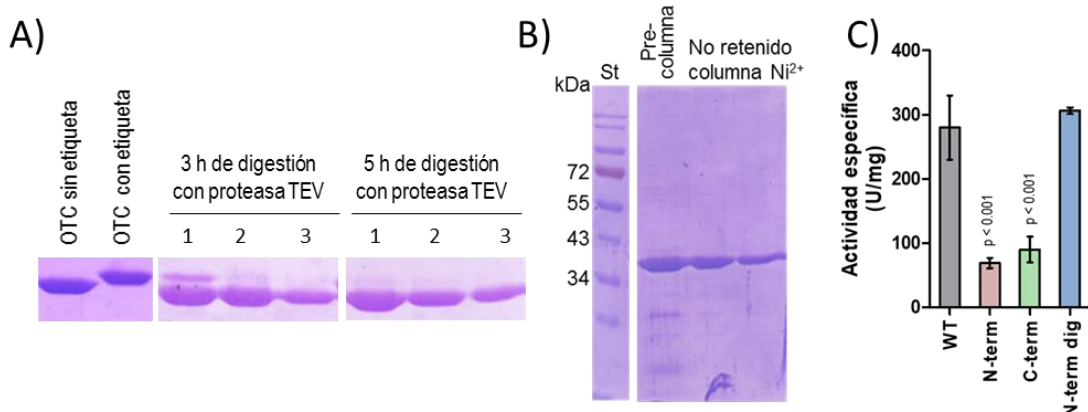


Figura 26. Análisis de la eficacia de digestión con proteasa TEV y valores de actividad específica (U/mg). **A)** Análisis electroforético de la eficacia de digestión con proteasa TEV de la OTC con etiqueta en el extremo N-terminal. **(B)** Purificación de la forma digerida por columna de afinidad de Ni²⁺ centrífuga. **(C)** Actividad específica de las distintas formas y de la forma His₆-OTC digerida y pasada por la columna (barra final del diagrama de barras).

El alto grado de pureza de esta muestra y su actividad, comparable al de la OTC producida sin etiqueta (Fig. 26C), apoya que este método de producción de OTC recombinante sea una potente alternativa para purificar OTC humana recombinante. Con el objetivo de reproducir este procedimiento de purificación de OTC, y a la vez ensayar un método de purificación de las proteínas más sencillo y a menor escala, se realizó una prueba piloto que se describe a continuación, utilizando la OTC purificada de esta manera para realizar la caracterización cinética que se describe más adelante.

4.6. Prueba piloto de purificación rápida de His₆-OTC y digestión con TEV

Puesto que en el laboratorio se purifican otras proteínas por cromatografía de afinidad a Ni²⁺ rápida usando una pequeña columna de Ni centrifugable, hicimos una prueba piloto de purificación rápida con uso exclusivo de esta columna.

Para ello se partió de cultivos de 20 ml inoculados con glicerinado de BL21 portadoras de pLIC-HuOTC y pGroEL/ES. El protocolo de inducción de la expresión de His₆-OTC fue el mismo que el descrito en secciones anteriores y la purificación se hizo con la columna His Spin-Trap (GE Healthcare), con la particularidad de que la proteína purificada se sometía luego a digestión con proteasa TEV marcada con etiqueta de polihistidinas. Para posteriormente someterla a un nuevo paso de cromatografía de afinidad centrífuga que debe retener la etiqueta escindida, La posible pequeña fracción no digerida de forma con etiqueta y la proteína TEV (por estar etiquetada), dejando pasar la forma de OTC sin etiqueta.

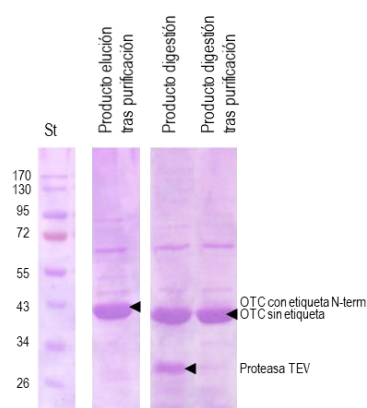


Figura 27. Análisis electroforético de las muestras de OTC con etiqueta amino-terminal purificada con columna His Spi-Trap antes y tras su digestión con proteasa TEV etiquetada con poli-His. Las puntas de flecha superior, intermedia y de más abajo señalan, respectivamente, las posiciones de las bandas de la OTC etiquetada, sin etiqueta y de la proteasa TEV. Obsérvese la fácil eliminación de proteasa TEV con el segundo pase por la columna. La proteasa TEV se produce recombinantemente en el laboratorio con etiqueta de polihistidinas y se purifica con cromatografía de afinidad de níquel.

El análisis electroforético de las distintas fracciones (Fig. 27) revela que este procedimiento rápido consigue una purificación menos perfecta que la obtenida usando FPLC, dando una pureza final del orden del 70% (estimación densitométrica) de la forma sin etiqueta, pero consiguiendo los objetivos de eliminar restos de OTC etiquetada (punta de flecha superior) y de la proteasa TEV (punta de flecha de más abajo) aislando así la OTC sin etiqueta en una purificación con mínimas manipulaciones, en tiempo récord de minutos (si excluimos las tres horas de digestión con TEV).

4.7. La cinética de la forma de OTC aislada en el ensayo piloto de escisión de etiqueta con TEV es indiferenciable respecto a la de la OTC producida inicialmente sin etiqueta

Finalmente, comparamos la dependencia de la actividad con respecto a las concentraciones de ambos sustratos, ornitina y carbamil fosfato para la OTC purificada originalmente sin etiqueta y para la OTC aislada en el ensayo piloto tras escindirle la etiqueta amino-terminal. Como la forma sin etiqueta producida por el procedimiento rápido es menos pura que la originalmente purificada sin etiqueta, corregimos los valores de la primera para llevarlos a 100% de pureza (estimación densitométrica; purezas de 52-64%). Luego superpusimos los resultados en la Fig. 29, ajustándose ambos a la misma hipérbola, evidenciando la restauración de la actividad normal de la forma sin etiqueta, aunque la haya poseído con anterioridad, atribuyendo así de forma robusta y concluyente la baja actividad de la forma etiquetada a la presencia de la etiqueta.

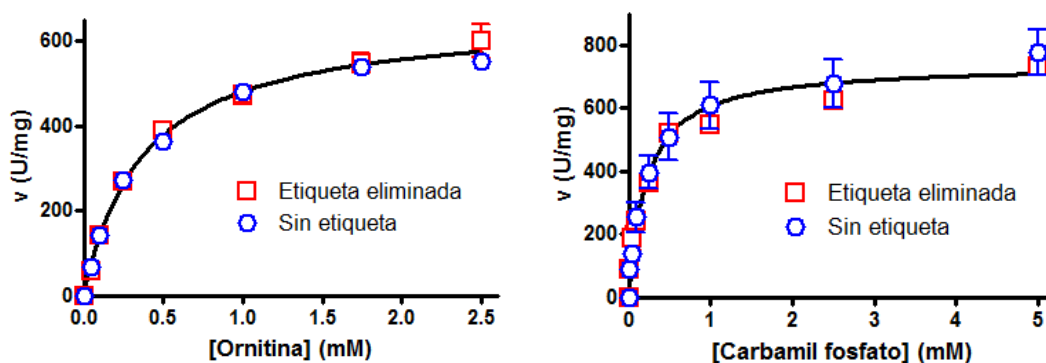


Figura 28. Dependencia de la actividad respecto a la concentración de los sustratos. En azul, forma producida originalmente sin etiqueta. En rojo, forma que se produjo con etiqueta N-terminal y de la que se eliminó la etiqueta por escisión con TEV y pase por columna centrífuga de afinidad.

5. CONSIDERACIONES FINALES

En conclusión, en este trabajo se ha conseguido producir de manera soluble y utilizando como sistema de expresión células BL21 de *E. coli*, dos formas de OTC humana recombinante con etiqueta de polihistidinas, bien en el extremo N-terminal, bien en el extremo C-terminal, ambas en abundancia y alto grado de pureza. El procedimiento de purificación de estas formas de OTC humana con etiqueta de polihistidinas, cuyo paso principal es una cromatografía de afinidad utilizando columna de níquel, es más sencillo que el habitualmente utilizado en el laboratorio para purificar OTC recombinante humana en ausencia de etiquetas, y tiene un rendimiento de aproximadamente del doble. Sin embargo, es cierto que la actividad enzimática de estas formas de OTC humana con etiquetas de polihistidinas es considerablemente menor que la de la forma sin etiqueta, lo que sugiere que las etiquetas interfieren o con la arquitectura o con la función de la OTC humana. Hemos probado que es así porque la escisión de la etiqueta de polihistidinas, posible para la forma etiquetada en el N-término, recupera la actividad específica de la enzima, que exhibe además idénticos parámetros cinéticos a los de la forma sin etiquetas. Así, hemos abierto el paso a la purificación rápida de OTC recombinante humana por un procedimiento dependiente de etiqueta e independiente de las cualidades intrínsecas del enzima, que de este modo puede ser mutado a voluntad para reproducir formas aberrantes presentes en pacientes con déficit de OTC sin afectar a su purificación. No sería este el caso, por ejemplo, para la purificación por afinidad a PALO de formas afectadas en la unión de los sustratos a la OTC. Confiamos en que nuestros resultados también faciliten mucho las estrategias de identificación de nuevos fármacos para el déficit de OTC, en las formas en que la mutación inestabiliza la proteína.

6. BIBLIOGRAFÍA

ARRANZ, J. A.; RIUDOR E.; MARCO-MARÍN, C. & RUBIO, V. (2006). Estimation of the total number of disease-causing mutations in ornithine transcarbamylase (OTC) deficiency. Value of the OTC structure in predicting a mutation pathogenic potential. *J Inherit Metab Dis*, 30: 217-226.

BRADFORD, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72: 248-254.

BRUSILOW, S. W. & MAESTRI, N. E. (1996). Urea cycle disorders: diagnosis. Pathophysiology and therapy in *Advances in Pediatrics*. Editorial Mosby-Year Book, Inc. New York. 127 pp.

CALDOVIC, L.; ABDIKARIM, I.; NARAIN, S.; TUCHMAN, M. & MORIZONO H. (2015). Genotype-phenotype correlations in ornithine transcarbamylase deficiency: A mutation update. *J Genet Genomics*, 42: 181-194.

CLIMENT C. (2000). Tesis Doctoral. Bases moleculares del déficit congénito de ornitina transcarbamilasa. Instituto de Biomedicina de Valencia. 193 pp.

DÍEZ-FERNANDEZ, C. (2015). Using Recombinant Human Carbamoyl Phosphate Synthetase 1 (CPS1) for studying this enzyme's function, regulation, pathology and structure. Tesis Doctoral. Instituto de Biomedicina de Valencia. 172 pp.

GAMBLE, JG. & LEHNINGER, AL. (1973). Transport of ornithine and citrulline across the mitochondrial membrane. *J Biol Chem*, 248: 610-618.

GROMPE, M.; JONES, SN.; LOULSEGED, H. & CASKEY, CT. (1992). Retroviral-mediated gene transfer of human ornithine transcarbamylase into primary hepatocytes of spf and spf-ash mice. *Hum Gene Ther*, 3: 35-44.

HÄBERLE, J.; BURLINA, A.; CHAKRAPANI, A.; DIXON, M.; KARALL, D.; LINDNER, M.; MANDEL, H.; MARTINELLI, D.; PINTOS-MORELL, G.; SANTER, R.; SKOUMA, A.; SERVAIS, A.; TAL, G.; RUBIO, V.; HUEMER, M. & DIONISI-VICI, C. (2019). Suggested guidelines for the diagnosis and management of urea cycle disorders: First revision. *J Inherit Metab Dis*, 10.

HÄBERLE, J. & RUBIO, V. (2014) Chapter 4: Hyperammonemia and related disorders. In Blau N.; Duran R.; Gibson KM.; Blaskovics M.; Dionisi-Vici C., editors. *Physicians Guide to the Diagnosis, Treatment, and Follow-Up of Inherited Metabolic Diseases*. Berlin, Heidelberg: Springer, 67-72.

HÄBERLE, J. & RUBIO, V. (2016). *Disorders of the Urea Cycle and Related Enzymes*. En Editorial Springer. Verlag Berlin Heidelberg. pp. 295-308.

HATA, A.; TSUZUKI, T.; SHIMADA, K.; TAKIGUCHI, M.; MORI, M. & MATSUDA, I. (1988). Structure of the human ornithine transcarbamylase gene. *J Biochem*, 103: 302-308.

HAUCKE, V. & SCHATZ, G. (1997). Import of proteins into mitochondria and chloroplast. *Trends Cell Biol*, 7: 103-106.

HOOGENRAAD, NJ.; SUTHERLAND, TM. & HOWLETT, GJ. (1980). Purification of ornithine transcarbamylase from rat liver by affinity chromatography with immobilized transition-state analog. *Anal Biochem*, 101: 97-102.

INDIVERI, C.; TONAZZI, A.; STIPANI, I. & PALMIERI, F. (1997) The purified and reconstituted ornithine/citrulline carrier from rat liver mitochondria: electrical nature and coupling of the exchange reaction with H⁺ translocation. *Biochem J*, 327: 349-355.

ISHII, N. (2017). GroEL and the GroEL-GroES Complex. *Subcellular Biochemistry*, 83: 483-504.

LAEMMLI, UK. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 15: 680-685.

LICHTER-KONECKI, U.; CALDOVIC, L.; MORIZONO, H. & SIMPSON, K. (2013). Ornithine Transcarbamylase Deficiency. *GeneReviews*, 1993-2019.

LINDGREN, V.; DE MARTINVILLE, B.; HORWICH, AL.; ROSENBERG, LE. & FRANCKE, U. (1984). Human ornithine transcarbamylase locus mapped to band Xp21.1 near the Duchenne muscular dystrophy locus. *Science*, 226: 698-700.

MAESTRI, NE.; LORD, C.; GLYNN, M.; BALE, A. & BRUSILOW, SW. (1998). *Medicine (Baltimore)*, 77: 389-397.

MARSHALL & COHEN PP. (1972). Ornithine transcarbamylase from *Streptococcus faecalis* and bovine liver. I. Isolation and subunit structure. *J Biol Chem*, 247: 1641-1653.

BRIAND, P.; FRANCOIS, B.; RABIER, D. & CATHELINEAU, L. (1982). Ornithine transcarbamylase deficiencies in human males. Kinetic and immunochemical classification. *Biochim Biophys Acta*, 704: 100-106.

MADAN, D.; LIN, Z. & RYE, HS. (2008). Triggering Protein Folding within the GroEL-GroES Complex. *The J Biol Chem*, 283: 32003- 32013.

MORIZONO, H.; TUCHMAN, M.; RAJAGOPAL, B. S.; MCCANN, M. T.; LISTROM, C. D.; YUAN, X.; VENUGOPAL, D.; BARANY, G. & ALLEWELL, N. M. (1997). Expression, purification and kinetic characterization of wild-type human ornithine transcarbamylase and recurrent mutant that produces 'late onset' hiperammonaemia. *Biochem. The J Biol Chem*, 322: 625-631.

MORI, M.; AOYAGI, K.; TATIBANA, M.; ISHIKAWA, T. & ISHII, H. (1977). N delta-(phosphonacetyl)-L-ornithine, a potent transition state analogue inhibitor of ornithine carbamoyltransferase. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 76: 900-904.

PENEFSKY, HS. (1977). Reversible binding of Pi by beef heart mitochondrial adenosine triphosphatase. *J Biol Chem*, 252: 2891-2899.

PIERSON, DL.; SHETTY L. COX & BRIAN E. GILBERT. (1977). Human Ornithine Transcarbamylase. *The J Biol Chem*, 252: 6464-6469.

PIZZI, MA.; ALEJOS, D.; TASNEEM, FH.; PALDEEP S. ATWAL, KRISHNAIENGAR, S. R. & FREEMAN, W. D. (2018). Adult Presentation of Ornithine Transcarbamylase Deficiency: 2 Illustrative Cases of Phenotypic Variability and Literature Review. 9: 30-36.

QUENTAL, R.; AZEVEDO, L.; RUBIO, V.; DIOGO, L. & AMORIM, A. (2009). Molecular mechanisms underlying large genomic deletions in ornithine transcarbamylase (OTC) gene. *Clin Genet*, 75: 457-464.

- RIVERA-BARAHONA, A.; SÁNCHEZ-ALCUDIA, R.; VIECELLI, HM.; RÜFENACHT, V.; PÉREZ, B.; UGARTE, M.; HÄBERLE, J.; THÖNY, B. & DESVIAT, LR. (2015). Functional characterization of the spf/ash splicing variation in OTC deficiency of mice and man. *PLoS One*, 10 (4).
- SANJURJO, P.; RODRIGUEZ-SORIANO, J.; VALLO, A. & RUBIO, V. (1991). Neonatal citrullinemia with satisfactory mental development. *Eur J Pediatr*, 150: 730-731.
- SANJURJO, P.; VALLO, A.; PRATS, J.M.; PERTEAGUDO, L.; RODRIGUEZ-SORIANO, J. y RUBIO, V. (1995). Intolerancia proteica con lisinuria (aciduria dibásica). A propósito de un caso. *Anal. Esp. Pediatr*, 42; 219-220.
- SHI, D.; MORIZONO, H.; YA, HA; AOYAGI, M.; TUCHMAN, M. & ALLEWELL, MN. (1998). 1.85-Å Resolution Crystal Structure of Human Ornithine Transcarbamoylase Complexed with N-Phosphonacetyl-L-ornithine. *The J Biol Chem*, 273: 34247- 34254.
- SUMMAR, ML.; KOELKER, S.; FREEDENBERG, D.; LE MONS, C.; HÄBERLE, J; LEE, HS. & KIRMSE, B. (2013). The incidence of urea cycle disorders. *Mol Genet Metab*, 110: 179-80.
- SUMMAR, ML & MEW, NA. (2018). Inborn Errors of Metabolism with Hyperammonemia: Urea Cycle Defects and Related Disorders. *Pediatr Clin North Am*, 65: 231-246.
- TARASENKO, TN.; ROSAS, OR.; SINGH, LN.; KRISTAPONIS, K.; VERNON, H. & MCGUIRE PJ. (2015). A new mouse model of mild ornithine transcarbamylase deficiency (spf-j) displays cerebral amino acid perturbations at baseline and upon systemic immune activation. *PLoS ONE*. 10 (2).
- VERES, G.; GIBBS, R.A.; SCHERER, S.E. & CASKEY, C.T. (1987). The molecular basis of the sparse fur mouse mutation. *Science*, 237: 415-417.
- XIANXIAN, ZHENG; LEON, E. ROSENBERG; FRANTISEK, KALOUSEK & WAYNW A. FENTON. (1992) GroEL, GroES, and ATP-dependent Folding and Spontaneous Assembly of Ornithine Transcarbamylase. *The Journal of Biological Chemistry*, 268: 7489-7493.
- HELMHOLTZ ZENTRUM MÜNCHEN. (1992) Ligase Independent Cloning (LIC), visto el 15 de julio de 2019 (<https://www.helmholtz-muenchen.de/fileadmin/PEPF/Protocols/LIC-cloning.pdf>)
- TAKARA BIO GROUP. (2018) In fusión Cloning FAQs, visto el 20 de julio de 2019 (<https://www.takarabio.com/learning-centers/cloning/in%E2%80%90fusion-cloning-faqs>)

Anexo: METODOLOGÍA GENERAL

Extracción de DNA plasmídico (Miniprep)

Se utilizó el kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega), que se trata de un sistema de extracción del DNA plasmídico rápido y sencillo cuyo protocolo sigue los siguientes pasos:

- Lisis celular: el precipitado celular se resuspendió en 250 µl de la Solución de Resuspensión Celular y se transfirió la suspensión celular a un tubo Eppendorf de 1.5 ml, donde se le añadieron 250 µl de la Solución de Lisis Celular. La solución se mezcló invirtiendo el tubo 4 veces y se incubó 5 min a temperatura ambiente.
- Inactivación de endonucleasas: Se añadió 10 µl de la Solución de Proteasa Alcalina a la mezcla, que se volvió a invertir 4 veces y se incubó 5 min a temperatura ambiente.
- Renaturalización de DNA y precipitación de impurezas: se le añadió 350 µl de Solución de neutralización, se mezcló por inversión y se centrifugó a máxima velocidad durante 10 min a temperatura ambiente con la centrífuga Eppendor Centrifuge 5415.
- Unión de DNA plasmídico a la columna: las columnas se colocaron en tubos colectores de 2 ml y se decantó el lisado celular neutralizado para centrifugarlo 1 min a máxima velocidad a temperatura ambiente. Se descartó el eluido, pues el ADN plasmídico queda retenido en la columna.
- Lavado: se añadió 750 µl de Solución de Lavado con etanol a las columnas y se centrifugó a máxima velocidad, 1 min a temperatura ambiente. Se realizó un segundo lavado con 250 µl en las mismas condiciones, descartándose los eluidos y centrifugándose las columnas de nuevo 2 min a máxima velocidad a temperatura ambiente.
- Elución: finalmente el ADN plasmídico se eluyó por centrifugación, cambiando previamente el tubo Eppendorf donde se recogió el eluido, tras añadir 50 µl de agua libre de proteasas y centrifugar 2 min a máxima velocidad.

El producto de la extracción se cuantificó midiendo la absorbancia del mismo a 260 nm con el Nanodrop 1000.

Electroforesis en gel de agarosa

Se realizaron electroforesis en geles de agarosa para separar ácidos nucleicos, sometidos a una corriente eléctrica, en función de su tamaño. Las moléculas de DNA más grandes migran menos en el gel y las moléculas de menor tamaño migran más rápido y por tanto avanza más en el gel. El tamaño de los poros que forman un gel de agarosa depende de la concentración de agarosa en el gel, y ésta es seleccionada de manera que sea adecuada para separar las moléculas de DNA de interés en la muestra. En este trabajo he utilizado geles de agarosa al 1%, que permiten separar ácidos nucleicos.

La agarosa para preparar estos geles se preparó disolviendo 1 g de agarosa (Condalab) en 100 ml de tampón TAE (40 mM Tris, 20 mM ácido acético, 1 mM EDTA), calentando la disolución hasta el punto de ebullición para así permitir la obtención de una disolución homogénea. Tras dejar atemperar esta solución, se vertió en un soporte adecuado en presencia de un peine que

tras la solidificación del gel, dio lugar a la formación de los pocillos donde se cargan las muestras. Las muestras se prepararon añadiendo 1 μ l de tampón de carga (30% glicerol, 0.25% azul Bromofenol, 0.25% xylene cyanole FF) por cada 5 μ l de muestra. Se utilizó como marcador de peso molecular O'GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific). La electroforesis se llevó a cabo en TAE 1X, durante 25 minutos a 100 V. El gel se tiñó posteriormente 10 min en solución GelRed 3x (Biotium), una solución fluorescente para teñir ácidos nucleicos, y las bandas se visualizaron con el transluminador ULTima 16si-Plus (ISOGEN Life Science).

Electroforesis en gel de poliacrilamida

Las proteínas se separaron electroforéticamente en función de su masa molecular, usando geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE). El SDS es un detergente aniónico que provoca la desnaturalización de las proteínas y les confiere una carga negativa casi uniforme, por tanto, cuanto más larga la cadena polipeptídica, más moléculas de SDS se unirán a ella, proporcionando una relación masa/carga uniforme para todas las proteínas. Por tanto, podemos asumir que la migración de las proteínas en el gel está directamente relacionada con el tamaño de la proteína desplegada. La concentración de poliacrilamida utilizada para realizar el gel depende del tamaño de la proteína que se desea separar. En mi caso, dado que he trabajado con la OTC humana, cuyo tamaño es de aproximadamente 37 kDa, he utilizado geles de poliacrilamida al 12%.

Los geles de poliacrilamida se prepararon incluyendo una fracción de apilamiento (*stacking*), en la que la muestra se concentra favoreciendo que las distintas proteínas entren a la vez en la segunda fracción, propiamente resolutive, en la que las proteínas se separan en función de su tamaño. Estas fracciones del gel, se prepararon tal y como se indica en la tabla A1:

Tabla A1. Preparación de las soluciones de poliacrilamida usadas en SDS-PAGE.

	Separador	Concentrador
Acrilamida/Bisacrilamida 37.5: 1 (40%)	1.5 ml	0.23 ml
H ₂ O	2.2 ml	1.5 ml
Separador 4%/ Concentrador 4%	1.25 ml	0.5 ml
APS 10%	56 μ l	14 μ l
TEMED	2.5 μ l	2.5 μ l

Las muestras se prepararon añadiendo 5 μ l de tampón de carga Laemmli 5x (312.5 mM Tris HCl pH 6.8, 2.2 M β -mercaptoetanol, 10% SDS, 43.8% glicerol y 0.02% azul de bromofenol) por cada 25 μ l de volumen final de muestra. Previamente a cargar las muestras en el gel, éstas se hirvieron durante 5 min, para desnaturizar las proteínas y favorecer la unión del SDS. Se utilizó el marcador de masa molecular Page Ruler Prestained Protein Ladder (3 μ l). La electroforesis se llevó a cabo a 200 V durante 50 min a 200 V utilizando el sistema mini-Protean de BioRad. Los geles se tiñeron con una solución Coomassie Blue (10 % v/v ácido acético; 35% v/v etanol; 0.1 g/100 mL Brilliant Blue R250) durante 10 min. El ácido acético de esta solución permite la fijación de las proteínas mientras que el Brillant Blue que se une de manera inespecífica a las mismas. Tras la tinción, el gel se destiñó en solución de desteñir (10% de ácido acético glacial ;10% de etanol)

durante un tiempo variable. Tiempos cortos (unos 15 minutos) me permitieron identificar si OTC estaba en la fracción soluble o insoluble del sonicado centrifugado, o qué reacciones de la purificación contenían OTC, pero fueron necesarios tiempos más largos (de aproximadamente 2 horas), para poder desteñir suficientemente el gel como para determinar la pureza de OTC en las distintas muestras.

Cuantificación de la concentración de proteína por el método Bradford

El método Bradford (Bradford, 1976) es una técnica colorimétrica que permite la cuantificación de la concentración de proteínas por la reacción de los grupos aniónicos del colorante Coomassie Brilliant Blue G-250 con los grupos amino de las proteínas. Para llevar a cabo esta técnica, utilicé el reactivo Bradford de la casa comercial BioRad (Bio-Rad Bradford Protein Assays), que es adquirido como una solución 5x, que ha de ser diluida 5 veces en agua previamente a cada ensayo. En cada ensayo se realizó una recta patrón, utilizando Albúmina de suero bovino (BSA) como estándar. Se prepararon 7 tubos con cantidades variables de BSA (entre 0 y 7 μg). También se prepararon tantos tubos como fue necesario a partir de las muestras a cuantificar. A cada uno de los tubos se le añadió 1 ml de reactivo Bradford 1x. Los tubos se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente, tras los cuales se midió la absorbancia a 595 nm en cubetas de plástico de 1 ml, usando para ello un espectrofotómetro Ultrospec 2000 (Pharmacia Biotech). Los valores de Absorbancia respecto a μg de proteína obtenidos para los tubos de BSA, se utilizaron para interpolar las absorbancias obtenidas en los tubos muestra, cuantificando así los μg de proteína en los mismos, y la concentración de proteína en las muestras correspondientes.

Preparación de glicerizados

De todos los cultivos de células transformados a partir de las construcciones preparadas en este trabajo, se prepararon glicerizados, que fueron almacenados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Para ello, 1 mL de cultivo crecido hasta saturación se suplementó con glicerol a concentración final de 25%. El glicerol es un crioprotector que disminuye el impacto que tiene la formación de cristales sobre la integridad de las células a tan baja temperatura. Estos glicerizados se han utilizado como reservorio de las construcciones realizadas a lo largo de todo el trabajo, y para inocular los cultivos utilizados en los ensayos de expresión de OTC recombinante en sus distintas formas.