

Centro de Investigación en Alimentación y
Desarrollo, A. C.

**SOBREEXPRESIÓN DE LA LACTATO
DESHIDROGENASA RECOMBINANTE DE CAMARÓN
BLANCO *Litopenaeus vannamei* Y EVALUACIÓN DE LA
ACTIVIDAD ENZIMÁTICA**

POR:

Manuel de Jesús Ochoa Valdez

TESIS APROBADA POR LA COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE
ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRÍA EN CIENCIAS

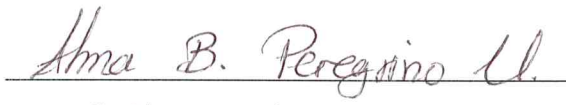
Hermosillo, Sonora

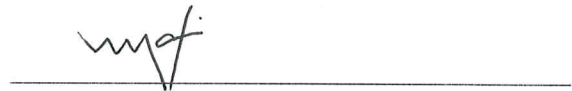
Diciembre de 2012

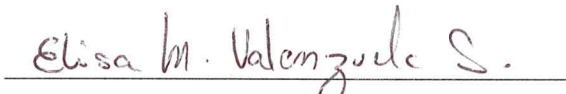
APROBACIÓN

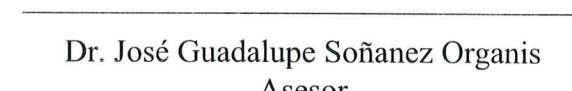
Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Manuel de Jesús Ochoa Valdez, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias.


Dra. Gloria Yepiz Plascencia
Directora de Tesis


M.C. Alma Beatriz Peregrino Uriarte
Asesora


Dra. María Auxiliadora Islas Osuna
Asesor


Dra. Elisa M. Valenzuela Soto
Asesora


Dr. José Guadalupe Soñanez Organig
Asesor


Dr. Rogerio Rafael Sotelo Mundo
Asesor

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.



Dr. Pablo Wong González
Director General

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Biología Molecular de Organismos Acuáticos de la Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Animal del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. El apoyo financiero para su realización fue proporcionado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), a través del proyecto 98507 aprobado a la Dra. Gloria Yepiz Plascencia y por una beca para estudios de maestría a Manuel de Jesús Ochoa Valdez.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a **CONACyT** por haber proporcionado la beca de maestría y al proyecto 98507 “Expresión de genes glucolíticos y antioxidantes en respuesta a la hipoxia en el camarón blanco *Litopenaeus vannamei*” de la Dra. Gloria Yepiz Plascencia.

Al **Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo** por abrirme sus puertas y usar las instalaciones y equipos para la realización de mi trabajo experimental.

Agradezco infinitamente a mi Directora de Tesis la **Dra. Gloria Yepiz Plascencia** por ser una persona digna de admiración y respeto, por haberme dado toda su confianza, paciencia, comprensión y muestras de apoyo durante mi estancia en su laboratorio. Gracias por dejarme ser uno de sus estudiantes y sin miedo a equivocarme puedo decir que no pude haber escogido un mejor asesor.

A la **M. en C. Alma Beatriz Peregrino Uriarte** por todo el conocimiento teórico y práctico dentro del laboratorio, así como su paciencia y apoyo incondicional. Por dejarme ver y conocer a la gran persona y mujer que es. Creo que de entre todos a usted es a quien más tengo que agradecer por haber sido una segunda madre para mí en lo personal, por siempre estar ahí para escucharme y ayudarme, y por nunca abandonarme, aún incluso cuando en ocasiones me llegué a abandonar a mí mismo. Siempre le estaré eternamente agradecido.

A la **M. en C. Lilia Leyva Carrillo** por ser una maestra, estudiante y amiga. Gracias por intentar siempre darme mis jalones de oreja y tratar de enseñarme el buen camino aunque mi cabezota dura a veces se rehusaba a escuchar.

A mi comité de tesis integrado por la **Dra. Gloria Yepiz Plascencia, M.C. Alma Beatriz Peregrino Uriarte, Dra. Elisa Miriam Valenzuela Soto, Dr. Rogerio Sotelo Mundo, Dra. María Auxiliadora Islas Osuna, y Dr. José Guadalupe Soñanez**

Organis por todo su apoyo y conocimiento invaluable para que este trabajo se realizara.

Quiero además agradecer especialmente a la **Dra. Elisa Valenzuela** por permitirme el acceso a su laboratorio de Proteínas de Resistencia al Estrés, donde hice los análisis enzimáticos y por todos sus conocimientos en enzimología. También quiero agradecer al **Dr. Pablo Valenzuela** por su invaluable apoyo como maestro y amigo (no importa que discrepemos en ideologías políticas), así también a la **M.C. Ciria Figueroa** por su paciencia y apoyo.

Quiero agradecer especialmente a los amigos que hice durante esta etapa y matizaron mi vida:

CIAD: Bertha (mi roomie regañona, mandona y muy coda), Antonio García Triana, Sarahí Vega, Pablo Valenzuela, Carlos Trasviña (CHTA), José Alfredo Martínez, Max Hernández, Sergio Leal, Fausto Cantú, Salvador Carrasco, Manuel Carrasco, Olivert Martínez, Monserrath Félix, Keni Cota, cDra. Rosa Olivia Méndez, Dr. Fernando Ayala.

Tae Kwon Do: Profesor Gilberto Contreras, Lea Muñoz, Ramses Siqueiros, Luis Valencia, Antonio Orci, Gustavo Puebla, José Manuel, Alejandro, Ricardo, Sebastián, Ilka, Alexis, Roberto, Arturo, Saúl, Lino, David y todos los niños de la clase de 7-8.

Hermosillo: Jorge Valenzuela, Juan Casillas, Santiago Tomás, José Álvarez, Rex Gómez, Araceli Molina, Damariz Parra, Enrique Moreno, Mi amiga y vecina de pisteadas Lupita.

A mis **compañeros de maestría** y todas aquellas personas que han compartido conmigo esta etapa y que pude haber omitido.

DEDICATORIA

A Dios, por haber estado conmigo en cada momento, en cada prueba, y en cada titubeo, por darme la convicción y la fuerza para terminar este proyecto, así como la inteligencia, carácter y habilidades para alcanzar mis metas.

*A mi **Familia** por siempre estar a mi lado en los buenos y malos momentos, apoyándome en cada una de mis decisiones, algunas más descabelladas que otras, y por hacer siempre su mayor esfuerzo por tratar de entenderme.*

*A mis sobrinos **Luis Alfonso** y **Diego Roberto** por impulsarme a tratar de ser un buen ejemplo y una mejor persona. A Ellos especialmente les dedico esta Tesis, la primera que escribo esperando algún día poder leer las suyas cuando sean ya todos unos hombres.*

CONTENIDO

APROBACIÓN.....	ii
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL	iii
AGRADECIMIENTOS	v
DEDICATORIA	vii
CONTENIDO	viii
Lista de Tablas	x
Lista de Figuras.....	xi
RESUMEN.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES.....	3
El Trifosfato de Adenosina (ATP)	3
La Glucólisis	4
Metabolismo del Piruvato	6
Metabolismo del Lactato.....	7
Hipoxia.....	8
Mecanismos de Adaptación en Hipoxia.....	9
Metabolismo Alternativo en Hipoxia.....	9
Lactato Deshidrogenasa (LDH)	11
La Hipoxia y la LDH en Invertebrados.....	12
JUSTIFICACIÓN	14
HIPÓTESIS.....	15
OBJETIVOS	16
Objetivo General.....	16
Objetivos Específicos.....	16
MATERIALES Y MÉTODOS	17

Preparación y Amplificación del cDNA de las Subunidades de la LDH.....	17
Diseño de Oligonucleótidos y Reamplificación.....	18
Preparación del Vector de Sobreexpresión pTXB1	19
Construcción del Plásmido Recombinante	20
Secuenciación de Clones Positivos	22
Sobreexpresión de las Subunidades LDH1 y LDH2.....	23
Purificación por Cromatografía de Afinidad	24
Zimograma	26
Ensayos de Actividad Enzimática.....	26
Análisis Cinético.....	27
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
Síntesis de los cDNA de las Subunidades de la LDH.....	28
Clonación de los cDNA de las Subunidades de LDH1 y LDH2	29
Digestión de los Amplicones de LDH y Vector de Sobreexpresión pTXB1	29
Construcción de los Plásmidos Recombinantes y Análisis de Colonias.....	30
Secuenciación de los Constructos Plasmídicos.....	31
Sobreexpresión de las Subunidades de LDH en <i>E. Coli</i> ER2566.....	39
Purificación de las Subunidades Recombinantes de la LDH.....	40
Zimograma	43
Ensayos de Actividad Enzimática y Análisis Cinético	44
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	47
BIBLIOGRAFÍA	49

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación y reamplificación de los cDNA de las subunidades de LDH. En subrayado se marcan los sitios reconocidos por las enzimas de restricción para la reamplificación.....	19
Tabla 2. Lista de oligonucleótidos utilizados para la identificación y secuenciación de los constructos plasmídicos pTXB1 – cDNA de LDH	23

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema general de la glucólisis.....	5
Figura 2. Esquema que representa la versatilidad del piruvato dentro del metabolismo de carbohidratos	7
Figura 3. Esquema general que representa las principales rutas del metabolismo del lactato en vertebrados.....	8
Figura 4. Amplificación por PCR de los fragmentos correspondientes a las subunidades de lactato deshidrogenasa a partir de los cDNA sintetizados del RNA de branquias y músculo.	28
Figura 5. Reamplificación del cDNA de LDH1 y LDH2 con iniciadores específicos diseñados para la formación de extremos cohesivos.....	29
Figura 6. Análisis electroforético de las digestiones del vector pTXB1 y los amplicones LDH1 y LDH2 con las enzimas de restricción NheI y XhoI	30
Figura 7. Clones positivos identificados mediante PCR de colonias que contenían los plásmidos con el cDNA de LDH de branquias y músculo.....	31
Figura 8. Comparación de la secuencia nucleotídica de LDH1 reportada y los insertos de los clones derivados de branquias. Las bases que aparecen resaltadas son los cambios encontrados entre las secuencias	33
Figura 9. Comparación de la secuencia de LDH2 reportada y los insertos de los clones correspondientes a músculo. Las bases resaltadas son los cambios encontrados entre las secuencias.....	35

Figura 10. Comparación de las secuencias aminoacídicas de LDH1 de <i>L. vannamei</i> con las obtenidas de los clones recombinantes con cDNA proveniente de branquias.....	37
Figura 11. Representación de la proteína de fusión LDH-inteína-proteína unidora a quitina y las proteínas producidas después de la liberación por la inteína.....	38
Figura 12. Comparación de las secuencias aminoacídicas de LDH2 de <i>L. vannamei</i> con las secuencias de los clones recombinantes con cDNA proveniente de músculo. Los aminoácidos que se encuentran resaltados son los cambios encontrados entre las secuencias aminoacídicas.....	39
Figura 13. Electroforesis en SDS-PAGE al 13% de las proteínas inducidas por IPTG a diferentes tiempos de incubación	40
Figura 14. SDS-PAGE al 13% teñido con nitrato de plata que muestra las diferentes etapas del proceso de purificación de la LDH2. BR, marcadores de peso molecular Broad Range; 1, pellet inducido sonificado; 2, clarificado; 3, lavados; 4, lo no retenido en la columna	41
Figura 15. Electroforesis en SDS-PAGE al 13% teñido con nitrato de plata de las fracciones eluidas (E1 - E6) de la cromatografía después de incubar con DTT, concentradas y precipitadas por TCA	42
Figura 16. SDS-PAGE al 13% que muestra las diferentes etapas del proceso de purificación de la LDH1. En el recuadro rojo del último carril se señala las bandas que corresponden a la proteína de fusión y la LDH1 libre. BR, marcador de peso molecular Broad Range; 1, no inducido; 2, inducido con 0.2 mM IPTG por 2 horas; 3, pellet sonificado; 4, clarificado; 5, no retenido; 6, segunda fracción eluida precipitada de 1 ml por TCA	43
Figura 17. Zimograma de la LDH2. Control (+): banda que corresponde a la LDH comercial; E1, E2, E3, E4 y E5 son las fracciones eluidas de la cromatografía.....	44

Figura 18. Cinética de reacción de la LDH2. Panel A: velocidad inicial vs concentración de piruvato; Panel B: gráfica de Lineweaver-Burk de los datos de velocidad inicial. Sustrato variable: piruvato, sustrato fijo NADH 100 μM46

RESUMEN

El metabolismo de los seres vivos es un compendio de proteínas, moléculas y mecanismos de regulación. La glucólisis es la ruta central del metabolismo energético y puede ocurrir en presencia o ausencia de oxígeno. El piruvato es el producto final de la glucólisis como resultado de la degradación de la glucosa. Cuando el oxígeno está presente, el piruvato es transformado en acetil-CoA para seguir los procesos respiratorios, en cambio en su ausencia puede seguir distintos destinos metabólicos que dependerán de las adaptaciones bioquímicas de cada organismo. La lactato deshidrogenasa (LDH) es una enzima oxido-reductasa que se encarga de la interconversión de piruvato-lactato en condiciones de baja tensión de oxígeno. La LDH se expresa diferencialmente y está formada por un grupo de 5 isoenzimas en vertebrados. En el camarón blanco *Litopenaeus vannamei* se conocen 2 subunidades tejido-específicas de la LDH que se expresan mayormente en branquias (LDH1) y músculo (LDH2). Estas subunidades están codificadas en un mismo gen y se expresan por corte y empalme alternativo. El objetivo de este trabajo fue sobreexpresar y caracterizar las 2 subunidades de la LDH. Para la sobreexpresión y purificación se utilizó el sistema comercial IMPACT™. Se sintetizaron los cDNA de mRNA de branquias y músculo que posteriormente se ligaron a un vector de sobreexpresión (pTXB1) para producir una proteína de fusión con afinidad por quitina. La purificación de la LDH2 se hizo por cromatografía en una matriz con quitina inmovilizada que se incubó con DTT para activar la reacción de inteína y eluir la proteína pura (LDH). Los análisis cinéticos se hicieron por espectrofotometría a 340 nm midiendo la oxidación del NADH para calcular $K_{m_{ap}}$ (0.1147 mM) y $V_{max_{ap}}$ (22.29 μ moles/min/mg de proteína). También se detectó la actividad por la conversión de lactato a piruvato por zimogramas y por la migración en los geles se deduce que la proteína activa es un tetrámero de 140 kDa.

Palabras claves: Lactato deshidrogenasa, ensayos cinéticos, sobreexpresión

ABSTRACT

The metabolism of all living organism is orchestrated by proteins, molecules and regulation mechanisms. Glycolysis is the first major pathway for energy production; it can occur in the presence or absence of oxygen. Pyruvate is a final product of the glycolysis pathway and is produced by glucose degradation reactions. In the presence of oxygen, pyruvate is converted to acetyl-CoA, but in oxygen absence, several and diverse metabolites are produced from piruvate by different biochemical processes. Lactate dehydrogenase (LDH) is an oxide-reducatae enzyme that catalyzes pyruvate-lactate interconversion under low oxygen concentration. LDH expression is differential and tissue-dependent and there are five isoenzymes known in vertebrates. In the white shrimp *Litopenaeus vannamei* there are 2 known subunits that are tissue-specific. These subunits are expressed differentially in gills and muscle and encoded by only one gene that produces both subunits by a mutually exclusive alternative splicing process. The aim of this work was to overexpress and characterize the LDH subunits using the IMPACT™ system. For this, the cDNAs were synthesized of mRNA from gills and muscle from *L. vannamei* and ligated to an overexpression vector (pTXB1) to produce a fusion protein containing a chitin binding protein. The purification of the recombinant LDH2 was done using chitin affinity chromatography. The bound protein was eluted from the column after incubation with DTT, a step that activates the intein reaction and releases the target (LDH) desired protein. The LDH2 activity was determined by spectrophotometry by measuring NADH oxidation reaction at 340 nm. The enzyme activity was detected by zymograms and appears to be a ~140 kDa tetramer. $K_{m_{ap}}$ (0.1147 mM) and $V_{max_{ap}}$ (22.29 μ moles/min/mg protein) data were obtained using kinetic analysis.

Key words: Lactate dehydrogenase, Enzyme assay, overexpression

INTRODUCCIÓN

Todos los seres vivos producen y consumen energía química en forma de trifosfato de adenosina (ATP). El ATP es una molécula derivada de los procesos metabólicos de la célula y que se genera a partir de las reacciones de oxido-reducción de la materia orgánica. Existen dos tipos principales de metabolismos involucrados en la producción de energía; el primero ocurre sólo cuando el oxígeno está presente (aeróbico) y lo utiliza como intercambiador y aceptor final de electrones. El segundo se lleva a cabo en ausencia de oxígeno (anaeróbico) y utiliza una molécula orgánica como aceptor final de electrones (Coenzima.com, 2011; Hill et al., 2004; Mathews et al., 2002).

En el metabolismo anaeróbico la glucólisis es principal ruta para la producción de energía; esta vía es catalizada por un grupo de 10 enzimas que se encarga de la degradación de la glucosa y otras hexosas hasta convertirlas en piruvato (Mathews et al., 2002). El piruvato producido en la glucólisis es metabolizado posteriormente a otras rutas encargadas generalmente a la producción de energía (Prong et al., 1996).

La ruta del lactato es una de las vías alternas para la producción de energía producto de la metabolización del piruvato en los procesos fermentativos de la célula, que se ha estudiado principalmente en vertebrados y se encarga de reducir el piruvato a lactato por la acción de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) (Brooks y Gaesser, 1980). La LDH es una enzima oxido-reductasa que cataliza la interconversión del piruvato a lactato utilizando NAD^+ como cofactor, además, es una proteína ampliamente distribuida que se encuentra presente en animales, plantas y bacterias (Holbrook et al., 1975; Voet y Voet, 2006). En la LDH de vertebrados se han identificado dos tipos de subunidades denominadas H y M. Las subunidades H y M pueden combinarse entre sí como una proteína tetramérica y configurar hasta 5 tipos de isoenzimas diferentes. También existe una subunidad C que se expresa principalmente en el tejido testicular de mamíferos, en aves y peces (Maekawa, 1988; Markert, 1963; Tsoi y Li, 1994). Todas las LDH son

estructuralmente muy conservadas, aun en organismos de distinto genero y especie. Sin embargo, poseen una alta variabilidad en propiedades cinéticas, debido especialmente a la configuración de la proteína activa (Bishop et al., 1972; Borgmann et al., 1975; Markert et al., 1975).

En invertebrados los estudios sobre la LDH continúan siendo aún muy limitados. En el camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei* se encontró recientemente que existían dos tipos de subunidades de la LDH aunque se desconocía si ambos polipéptidos daban lugar a proteínas activas. Los transcritos correspondientes a estas subunidades fueron aislados e identificados de branquias y músculo respectivamente, y se determinó que se expresan diferencialmente por corte y empalme alternativo mutuamente excluyente de la misma región del transcrito maduro (Soñanez-Organis et al., 2012). Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue sobreexpresar y purificar las subunidades de la LDH de *L. vannamei* y evaluar su actividad enzimática para conocer si ambos polipéptidos forman proteínas activas.

ANTECEDENTES

El Trifosfato de Adenosina (ATP)

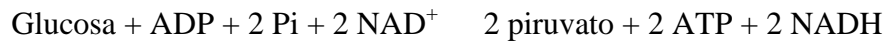
El trifosfato de adenosina o ATP es la principal molécula intercambiadora de energía y es utilizado por los organismos vivos para promover las reacciones químicas dentro de la célula. Además, es precursor de una serie de coenzimas esenciales como NAD^+ y Coenzima-A, participa durante la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas y como donador de grupos fosfato en los procesos de fosforilación por enzimas cinasas (Coenzima.com, 2011). El ATP es producto de las reacciones de óxido-reducción celular y puede obtenerse por dos procesos metabólicos distintos. El primero usa al oxígeno como aceptor final de electrones (aerobiosis) y el segundo lo hace a través de un intermediario orgánico (anaerobiosis) (Mathews et al., 2002).

En el metabolismo aeróbico se oxidan casi por completo cualquier materia orgánica, ya sea carbohidratos, lípidos o proteínas, produciendo ATP, CO_2 y H_2O como productos finales. Las principales rutas bioquímicas que conforman al metabolismo aeróbico son glucólisis, ciclo de los ácidos tricarboxílicos (Ciclo de Krebs), cadena de transporte de electrones y fosforilación oxidativa. Por cada molécula de glucosa pueden producirse 36 ATP (Hill et al., 2004). Por otra parte en el metabolismo anaeróbico muchas de las reacciones de óxido-reducción disminuyen su velocidad o son intercambiadas originándose un problema en los procesos bioquímicos de la célula (Hill et al., 2004).

La glucólisis es la principal vía para la producción de ATP a partir de carbohidratos en condiciones de anaerobiosis. La síntesis de ATP se lleva a cabo por fosforilación a nivel sustrato durante las reacciones por la fosforilación del ADP por las enzimas fosfoglicerato cinasa y piruvato cinasa. Cuando ésta ocurre solo se producen 2 ATP netos por molécula de glucosa, lo que representa el 7% de la energía total disponible en condiciones aeróbicas (Hill et al., 2004)

La Glucólisis

La glucosa es el principal proveedor de energía de la célula y es metabolizada primeramente a través de una serie de reacciones catalizadas por 10 enzimas y el conjunto de estas reacciones se denomina glucólisis. Esta ruta se encarga de convertir una molécula de glucosa en dos moléculas de piruvato (Figura 1) (Lunt y Vander Heiden, 2011; Plaxton, 1996).



La glucólisis puede dividirse en dos etapas. La primera etapa involucra las cinco primeras reacciones y se denomina fase de inversión de energía y es en donde se sintetizan azúcares intermediarios como producto de la adición de grupos fosfatos, lo que implica gasto de energía ya que se consume ATP y se producen azúcares de 3 carbonos. La segunda etapa corresponde a las últimas 5 reacciones y se denomina fase de generación de energía, ya que se producen 4 ATP por la transferencia de grupos fosfatos a moléculas de ADP. El producto final de la glucólisis es el piruvato, el cual después de sintetizado puede seguir otras vías metabólicas, y así continuar los procesos de producción de energía (aeróbica o anaeróbica) (Mathews et al., 2002).

En condiciones aeróbicas el piruvato es metabolizado hasta dióxido de carbono (CO₂) y agua a través de la ruta de los ácidos tricarboxílicos acoplada a la cadena de transporte de electrones y la fosforilación oxidativa, las cuales en conjunto producen altas concentraciones de ATP. No obstante la glucólisis es independiente de estas rutas y no requiere estrictamente de la presencia de oxígeno para metabolizar la glucosa, sin embargo, la producción global de ATP es disminuida en su ausencia (Berg et al., 2008; Lunt y Vander Heiden, 2011).

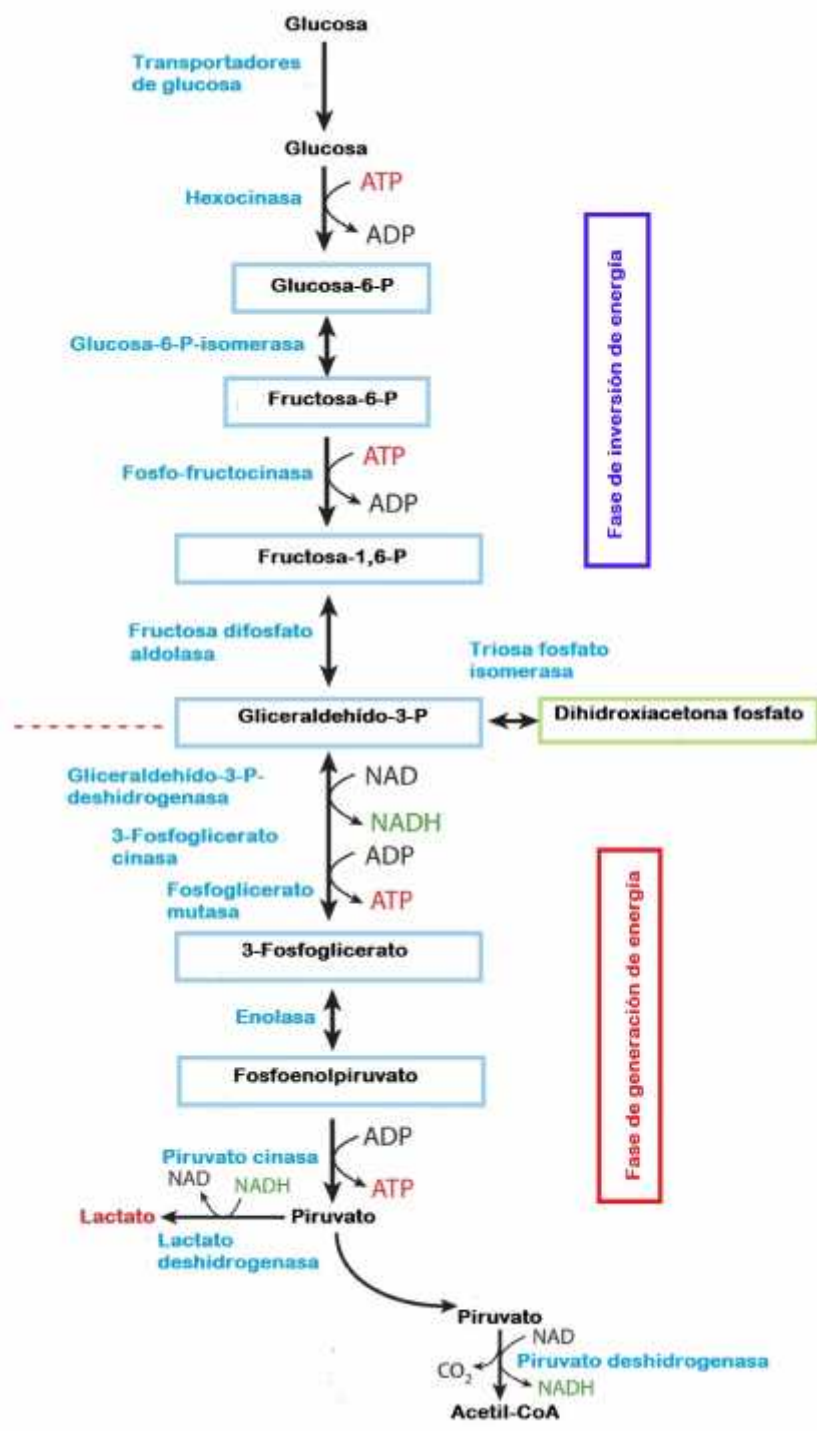


Figura 1. Esquema general de la glucólisis (Lunt y Vander Heiden, 2011)

Metabolismo del Piruvato

El piruvato es el producto final de la glucólisis y parte central del metabolismo del carbono ya que participa activamente en el desarrollo de varias rutas anabólicas y catabólicas (Pronk et al., 1996). El principal destino metabólico del piruvato es la producción de energía en los procesos respiratorios que ocurren en el interior de la matriz mitocondrial a donde es transportado y posteriormente transformado en acetil-CoA para su correcta oxidación (Sugden y Holness, 2003). Por otra parte en los procesos fermentativos el piruvato puede ser reducido en múltiples compuestos orgánicos, dióxido de carbono o hidrógeno molecular (Figura 2) (Good y Muench, 1993; Pronk et al., 1996).

En las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida utilis*, así como numerosas especies de microorganismos principalmente levaduras, se producen una amplia variedad de metabolitos alternos en sus procesos fermentativos como etanol y dióxido de carbono, glicerol, ácidos orgánicos de cadena corta como acetato y succinato, y en menor proporción lactato (Good y Muench, 1993; Pronk et al., 1996; van Dijken y Scheffers, 1986; Visser et al., 1995). En las plantas como el trigo, un descenso en sus niveles de ATP por el efecto de algún agente estresor las obliga a acelerar su proceso glucolítico dando lugar a un amplio número de metabolitos alternos entre los que también destacan aminoácidos (Effer y Ranson, 1967; Gibbs et al., 1986; Good y Crosby, 1989). En animales, principalmente en aquellos resistentes a condiciones de hipoxia y anoxia se han encontrado numerosas combinaciones de metabolitos alternos, aunque en mamíferos como los seres humanos por ejemplo, el piruvato se convierte en lactato y se acumula en los músculos (Fields, 1983; Gladden, 2004).

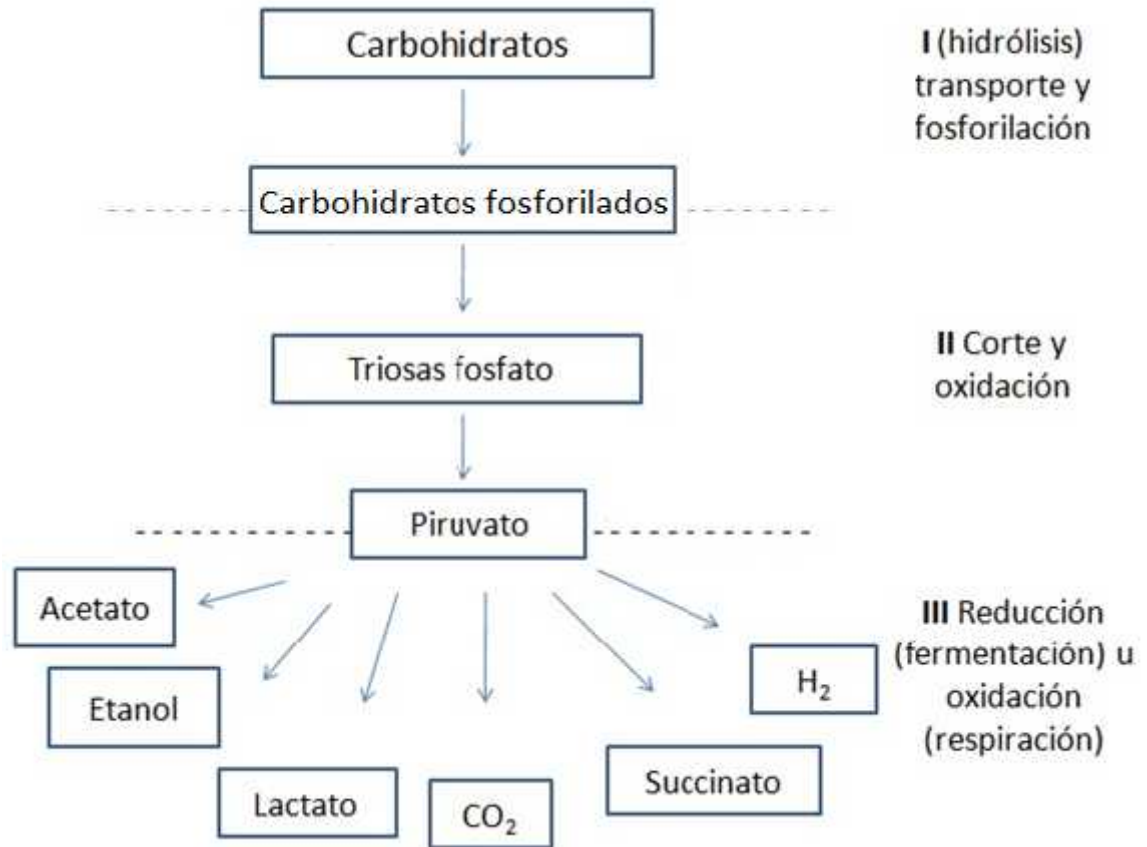


Figura 2. Esquema que representa la versatilidad del piruvato dentro del metabolismo de carbohidratos (Pronk et al., 1996).

Metabolismo del Lactato

El lactato se produce a partir de piruvato al final de la glucólisis en condiciones anaeróbicas, sin embargo su síntesis también ocurre de forma constante en los procesos aeróbicos especialmente durante el ejercicio para compensar la deficiencia energética cuando la tasa de la glucólisis y la glucogenólisis son elevadas. En vertebrados, el lactato es el principal metabolito alternativo de la metabolización del piruvato (Cohen y Simpson, 1975; Gladden, 2004; Milligan y Girard, 1993). El lactato puede permanecer varias horas en los tejidos de donde es difundido por el torrente sanguíneo a diferentes órganos como el corazón, el hígado y los riñones donde es remetabolizado a glucosa en la gluconeogénesis para reintroducirse a la glucólisis o crear nuevas reservas de glucógeno en los músculos mediante la glucogénesis (Figura 3) (Gleeson, 1991;

Mathews et al., 2002). Estudios en ratas y especialmente en mamíferos han demostrado una alta tasa de reoxidación a piruvato (Brooks y Gaesser, 1980), mientras que en aves existe una interconversión del lactato a glucosa (Groscolas y Rodriguez, 1982) y en cambio en reptiles, anfibios y peces generalmente éste es resintetizado a glucógeno para formar nuevas reservas en músculo. No obstante, todos los procesos antes descritos se llevan a cabo en menor o mayor proporción en todos los organismos (Fournier y Guderley, 1992; Gleeson y Dalessio, 1989).

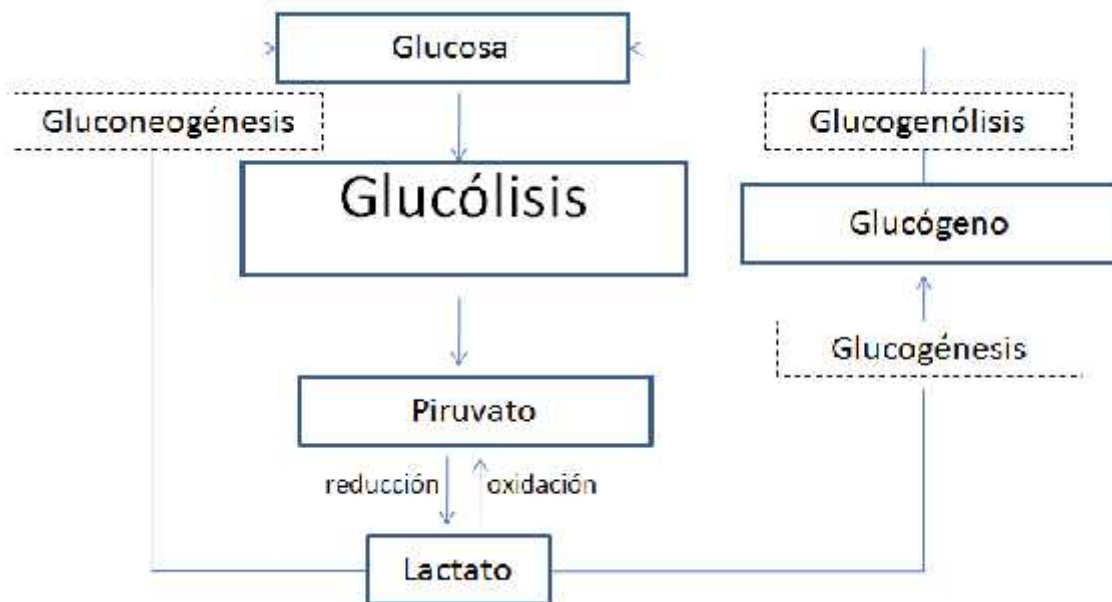


Figura 3. Esquema general que representa las principales rutas del metabolismo del lactato en vertebrados (Gleeson, 1991; Mathews et al., 2002).

Hipoxia

La hipoxia ocurre cuando la concentración de oxígeno disuelto en el ambiente es baja ($2.8 \text{ mg.L}^{-1} \text{ OD}$ en agua) y es uno de las principales agentes de estrés en los seres vivos, afectando especialmente a los ecosistemas marinos (Cheng et al., 2002; Diaz y Rosenberg, 1995). En los sistemas acuáticos naturales existen patrones normales y cíclicos de hipoxia-normoxia que suceden por la interacción de múltiples factores como las mareas, el viento, la estratificación, la fotosíntesis durante el día, y la respiración durante la noche (Brown-Peterson et al., 2008; David et al., 2005). La hipoxia no

regulada puede llegar a ser letal ya que repercute en múltiples formas y niveles en un organismo (conductual-bioquímico-fisiológico) (Burnett y Stickle, 2001; Wu, 2002).

Mecanismos de Adaptación en Hipoxia

En la naturaleza existen numerosas especies principalmente crustáceos, bien adaptadas y capaces de prosperar bajo diferentes periodos de hipoxia porque han desarrollado micro/macro-adaptaciones que les permiten sobrevivir en tales condiciones de estrés (Burnett y Stickle, 2001). Por ejemplo, el camarón café (*Penaeus aztecus*), el anfípodo (*Corophium arenarium*) y el equinodermo (*Holothuria forskali*) tienen sistemas de detección de oxígeno que les advierten migrar a zonas más favorables cuando las concentraciones de oxígeno disminuyen (Gamble, 1971; Newell y Courtney, 1965; Renaud, 1986). En otros casos existe evidencia de sistemas de hiperventilación que aumentan la capacidad respiratoria de un organismo permitiéndole captar la mayor cantidad de oxígeno posible en su ambiente, por ejemplo la trucha arcoíris (*Salmo gairdneri*) aumenta su capacidad respiratoria hasta 13 veces en branquias (Holeton y Randall, 1967). Además, hay organismos capaces de modular su consumo de oxígeno en base a su disponibilidad en el ambiente como el molusco *Metulus edulis* o mejillón del atlántico (Herreid II, 1980).

Metabolismo Alternativo en Hipoxia

La supervivencia de un organismo depende de la coordinación de sus procesos celulares encargados del buen funcionamiento de sus sistemas vitales, que son capaces de responder a cambios ambientales (Semenza et al., 1994). El oxígeno es un potente inductor de cambios en las rutas metabólicas por la modulación de las enzimas involucradas, estos efectos pueden ser notorios a nivel celular, bioquímico o molecular (Fandrey, 1995; Greenway y Storey, 1999; Greenway y Storey, 2001; Wu y Lam, 1997).

En el cangrejo azul *Callinectes sapidus* sometido a hipoxia se reportó una disminución significativa en la síntesis de varias proteínas, incluyendo la superóxido dismutasa con

manganeso como cofactor (MnSOD), hemocianina y las proteínas ribosomales S15 y L23 (Hochachka et al., 1996). Efectos similares fueron descritos a nivel celular en hepatocitos de algunas especies de tortugas que disminuyen la síntesis de proteínas bloqueando los procesos de transcripción y traducción, promoviendo una síntesis proteica preferencial (Hochachka et al., 1996).

En el pez *Gillichthys mirabilis* se han observado patrones de expresión enzimática tejido-específica que cambian progresivamente al tiempo de exposición a hipoxia. Entre las enzimas afectadas se encontraba la lactato deshidrogenasa A, enolasa y triosa fosfato isomerasa, de las cuales se reportó un aumento de concentración principalmente en hígado, mientras que hubo un decremento de enolasa y gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa en corazón. También se aumentó la expresión de proteínas encargadas del catabolismo de aminoácidos como S-adenosilmetionina y cistationina sintasa que catalizan la degradación de metionina, así como varias aminotransferasas (Gracey et al., 2001). En mamíferos el incremento de enzimas glucolíticas, específicamente en el estudio de líneas celulares de seres humanos y de rata han mostrado un aumento en la expresión de genes de enzimas glucolíticas por la acción de un factor de transcripción hipoxia-inducible (HIF-1, siglas en inglés de Hypoxia Inducible Factor 1), que es una proteína nuclear que se une al DNA, regulando la expresión de genes (David et al., 2005; Semenza et al., 1994). Otros organismos son capaces de acumular glucógeno o aspartato y metabolitos alternos al final de sus rutas metabólicas los cuales son utilizados para producir ATP y solventar sus necesidades energéticas, e incluso algunas especies de crustáceos pueden deprimir completamente su metabolismo por la regulación, expresión y síntesis de sus proteínas (Burnett y Stickle, 2001; Greenway y Storey, 2001; Hochachka, 1993; Larade y Storey, 2002a; Larade y Storey, 2002b).

También la transcripción de RNAs específicos es potencializada. Así, se han descubierto nuevas proteínas, por ejemplo las correspondientes a los genes *fau* y *dADAR* en la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* que permiten una mejor y más rápida recuperación y una mayor sensibilidad en respuesta al oxígeno bajo condiciones de anoxia (Farahani y Haddad, 2003; Ma et al., 1999). Del mismo modo, en el caracol *Littorina littorea* se han descrito genes como *kvn* que aunque se desconoce su función, posiblemente actúa como

una proteína parecida a las ferredoxinas regulando las reacciones de transferencia de electrones, y el gen *sapr-19* del que se cree es un potencial regulador de calcio, ya que éste último aumenta en la hemolinfa bajo condiciones de anoxia (Larade y Storey, 2002a; Larade y Storey, 2004).

Lactato Deshidrogenasa (LDH)

La lactato deshidrogenasa (E.C. 1.1.1.27) es una enzima oxido-reductasa que se expresa diferencialmente dependiendo del tejido. La LDH cataliza la interconversión de piruvato-lactato utilizando nicotinamida adenina dinucleótido (NAD^+) como cofactor (Markert et al., 1975; Voet y Voet, 2006).



La LDH en vertebrados es una proteína tetramérica de aproximadamente 140 kDa conformada por dos tipos de subunidades “H” y “M” (también llamadas A y B) que se expresan por genes independientes. La subunidad H predomina en tejidos aeróbicos como corazón y músculos rojos, mientras que la subunidad M es característica de tejidos anaeróbicos como hígado y músculo esquelético. Ambas tienen una alta similitud en su composición aminoacídica e inter-subunidad que les permite unirse entre sí, y al combinarse pueden configurar 5 isoenzimas diferentes: LDH-5 (H_4), LDH-4 (H_3M_1), LDH-3 (H_2M_2), LDH-2 (H_1M_3) y LDH-1 (M_4) (Appella y Markert, 1961; Crawford et al., 1989; Maekawa, 1988; Markert et al., 1975).

También se ha identificado una tercera subunidad “C” cuyo gen se expresa preferencialmente en el tejido testicular de mamíferos, aves y peces (Tsoi y Li, 1994). Esta subunidad también puede formar homo o heterotetrámeros, pero posee un espectro de sustratos posibles más amplio. Además del piruvato y el lactato, puede usar como sustrato otros compuestos denominados α -hidroxiácidos, como α -hidroxivalerato que no es catalizado por las otras isoformas. Sin embargo, en algunas especies de lagarto y caimán, el homotetrámero M_4 si es capaz de actuar sobre los α -hidroxiácidos, por lo que se cree que el gen que codifica para la subunidad C está ancestralmente ligado a la

subunidad M por su semejanza tan alta en cuanto a propiedades físicas, cinéticas e inmunológicas (Markert et al., 1975; Markert, 1970).

A pesar de que todas las isoenzimas de la LDH llevan a cabo la misma reacción química, tienen una alta variabilidad en sus propiedades cinéticas como resultado de la combinación de las subunidades que las conforman viéndose más claramente reflejado en sus constantes de afinidad, concentraciones óptimas de sustrato, capacidad de utilizar cofactores análogos y la forma de interactuar con sus ligandos (Markert et al., 1975). Estructuralmente la LDH es muy similar entre especies; solo se ha observado que las secuencias aminoacídicas reportadas en vertebrados y nemátodos difieren de las reportadas en bacterias, micoplasma y plasmodio en 20 residuos hacia el extremo amino-terminal, mientras que en plantas las diferencia son de 40 residuos (Tsoi y Li, 1994). La enzima activa no necesita ningún metal para llevar a cabo la catálisis, sin embargo, los residuos de cisteína son muy importantes en las subunidades de la proteína para que su sitio activo trabaje correctamente. Tampoco se ha reportado la existencia de puentes disulfuro en su estructura (Holbrook et al., 1975).

La Hipoxia y la LDH en Invertebrados

Entre los diferentes géneros y especies marinas se reconoce especialmente algunas especies de organismos invertebrados como sumamente resistentes a condiciones de hipoxia ambiental, en particular ciertas especies de crustáceos, moluscos y anélidos (Herreid II, 1980; Wu, 2002). Dentro de los crustáceos, los decápodos son un grupo principalmente fuerte ya que tiene la capacidad de sobrevivir durante largos periodos en hipoxia (>1400 hrs) (Gray et al., 2002). No obstante, los mecanismos bioquímicos involucrados en estas respuestas apenas empiezan a ser estudiados.

Las características y propiedades de la lactato deshidrogenasa en invertebrados han sido muy poco estudiadas y al parecer resultan ser más variables que en vertebrados (Angers et al., 1994). El número de isoenzimas encontradas en crustáceos varía de una a cinco (Gleason et al., 1971; Kühl y Schneppenheim, 1986). Además, se ha encontrado que la LDH de algunos tipos de moluscos, anélidos (poliquetos), artrópodos (quelicerados) y

especies de crustáceos primitivos (cirrípedos) pueden metabolizar isómeros D-lactato, mientras que otras especies muestran solo especificidad por L-lactato (Gleason et al., 1971; Long, 1976; Scheid y Awapara, 1972). Asimismo en cirrípedos se han observado estructuras cuaternarias diméricas de la proteína como en bacterias (Holbrook et al., 1975; Selander et al., 1970).

La expresión tejido-específica de la LDH tampoco se ha descrito ampliamente en invertebrados, los principales estudios se han hecho en el quelicerado cangrejo cacerola *Limulus polyphemus* y la langosta *Homarus americanus* (Eichner y Kaplan, 1977; Long y Kaplan, 1968; Massaro, 1970). En *L. polyphemus* las subunidades de la LDH están codificadas en dos diferentes genes, una es predominante expresada en músculo (LDH-1), mientras que otra presenta una tasa de expresión más alta en corazón, gónadas y branquias (LDH-2) (Massaro, 1970; Selander et al., 1970). En la langosta *Homarus americanus* su comportamiento es muy similar a la de vertebrados y su expresión está dada por 2 genes que codifican para 2 tipos de subunidades que al combinarse resultan en un grupo de cinco isoenzimas que se distribuyen diferencialmente en los músculos de la cola (LDH-5, LDH-4), patas (LDH-2, LDH-1), cerebro y corazón (LDH-5, LDH-4, LDH-3, LDH-2, LDH-1) (Eichner y Kaplan, 1977). Tampoco se han realizado estudios extensivos de la LDH en los diferentes ciclos de vida de organismos invertebrados, o durante la exposición a cambios ambientales físico-químicos, en ciclos de muda, etc (Angers et al., 1994).

JUSTIFICACIÓN

Como se ha mencionado en capítulos anteriores, el ATP es la molécula que alimenta de energía los procesos celulares. En condiciones idóneas, el oxígeno es el principal aceptor de electrones y catalizador de las reacciones oxido-reductoras. Sin embargo, ante la escases del oxígeno, las células deben ser capaces de solventar y sostener sus propios procesos vitales. En este punto las rutas metabólicas y sus mecanismos de regulación se vuelven los protagonistas principales para la supervivencia y la producción de energía. El camarón blanco del Pacífico *L. vannamei* es una de las especies comerciales más importantes de crustáceos (Valenzuela et al., 2002). Esta especie se encuentra expuesta frecuentemente a hipoxia ambiental tanto en su hábitat natural como durante su cultivo.

En relación con la LDH en *L. vannamei*, estudios recientes han demostrado que este organismo posee 2 subunidades de la LDH que están codificadas en un mismo gen y que se expresan diferencialmente en branquias y músculo por corte y empalme alternativo mutuamente excluyente (Soñanez-Organis et al., 2012). El gen de la LDH de *L. vannamei* está compuesto por 7571 pb distribuidos en 8 exones y 7 intrones que varían considerablemente en tamaño. La LDH1 (mayormente expresada en branquias) contiene el exón 5, pero no el exón 6, mientras que el exón 6 solo está presente en la LDH2 (expresada en músculo) pero no el exón 5; ambas subunidades están formadas por 332 aminoácidos, y solo difieren en 15 aminoácidos. Esta estructura del gen interrumpido por 7 intrones la hace más similar a organismos vertebrados como el hombre, que a otros invertebrados que tienen un menor número de intrones (Soñanez-Organis et al., 2012). Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue sobreexpresar en bacteria las LDH1 y LDH2 y caracterizar la LDH formada por la subunidad LDH2, y así contribuir al conocimiento de los mecanismos bioquímicos que le permiten al camarón blanco *L. vannamei* sobrevivir a condiciones de hipoxia ambiental.

HIPOTÉISIS

Los transcritos maduros generados a partir del gen de la lactato deshidrogenasa del camarón *L. vannamei* por corte y empalme alternativo mutuamente excluyente, producen dos subunidades diferentes que generan a la enzima activa de la LDH.

OBJETIVOS

Objetivo General

Sobreexpresar las subunidades recombinantes de la LDH1 y LDH2 para obtener la proteína activa de las dos isoenzimas de lactato deshidrogenasa de camarón blanco *L. vannamei* y evaluar su actividad enzimática.

Objetivos Específicos

1. Clonar los DNA complementarios (cDNA) de las subunidades LDH1 y LDH2 en el vector de sobreexpresión pTXB1 del sistema IMPACT.
2. Determinar las secuencias nucleotídicas y seleccionar los constructos correctos para cada subunidad de LDH.
3. Sobreexpresar las subunidades de LDH recombinantes en *E. coli* ER2566 y purificar por afinidad a una matriz de quitina para obtener isoenzimas activas de lactato deshidrogenasa.
4. Evaluar cualitativamente la actividad enzimática por zimograma.
5. Evaluar y determinar las constantes cinéticas de Michaelis-Menten (K_m y V_{max}) de las proteínas recombinantes de lactato deshidrogenasa por espectrofotometría.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación y Amplificación del cDNA de las Subunidades de la LDH

El proceso de producción de la LDH recombinante se inició con la obtención de los DNA complementarios (cDNAs) que se sintetizaron a partir de los RNA totales provenientes de branquias de camarones sometidos a hipoxia por 24 horas y músculo de camarones en condiciones de normoxia. Los RNAs fueron donados para este trabajo por el Dr. Antonio García Triana y el M. en C. Salvador Carrasco Miranda del Laboratorio de Biología Molecular de Organismos Acuáticos (LBMOA) CIAD, A. C. Hermosillo, Sonora. La síntesis se llevo a cabo usando el kit comercial Quantitect Reverse Transcription™ (QIAGEN) y se siguieron las recomendaciones del fabricante, utilizando 1 µg de RNA total como templado.

El cDNA obtenido se utilizó como molde para amplificarlo por PCR convencional en reacciones de 26 µl utilizando 2 µl de cDNA como templado, 1 µl de oligonucleótido sentido LDHMinFw (10 µM), 1 µl de oligonucleótido antisentido LDH2rtRv (10 µM), y 22 µl de *Taq* DNA polimerasa Platinum SuperMix (Invitrogen). Las condiciones de amplificación fueron 3 minutos a 94 °C, 35 ciclos (1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 60 °C, 1 minuto y 30 segundos a 72 °C), y 5 minutos a 72 °C; y se guardo a 4 °C hasta su análisis. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador DNA Engine Dyad™ (PTC 220, Biorad). Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con GelRed™ (Biotium). Cabe Mencionar que los oligonucleótidos utilizados para amplificar los cDNAs completos de la LDH1 de branquias y LDH2 de músculo fueron previamente diseñados por la M. en C. Bertha Guadalupe Leal Rubio como parte de su trabajo de maestría en el LBMOA (Tabla 1).

Diseño de Oligonucleótidos y Reamplificación

Una vez amplificados los cDNA de las subunidades de la LDH, se reamplificaron con oligonucleótidos especialmente diseñados, para añadir en los extremos de las secuencias pequeños fragmentos que contienen sitios de reconocimiento para enzimas de restricción específicos del vector, los cuales al ser cortados produce sitios cohesivos en los cDNA (Tabla 1). El mismo sitio se encuentra en el vector de expresión seleccionado para la producción de la proteína recombinante. El diseño de oligonucleótidos modificados se hizo en base al protocolo del sistema IMPACT™ Kit (New England Biolabs) y se seleccionaron las enzimas de restricción *NheI* (Fermentas) que reconoce el sitio (GCTAGC) y *XhoI* (Fermentas) que reconoce el sitio (CTCGAG). Estos sitios de restricción son únicos en los extremos de las secuencias nucleotídicas de las subunidades de la LDH, así como también en el vector de sobreexpresión pTXB1. En la tabla 1 se presentan las secuencias de estos oligonucleótidos con las adiciones de los sitios de restricción en el extremo 5'.

La reamplificación de los cDNA se hizo por PCR convencional con los oligonucleótidos modificados en reacciones de 25 µl, donde se utilizó 1 µl de la amplificación anterior de los cDNA como templado, 1 µl de oligonucleótido sentido LDHNheIFw (10 µM), 1 µl de oligonucleótido antisentido LDHXhoIRv (10 µM), y 22 µl de *Taq* DNA polimerasa Platinum Supermix. Las condiciones de la PCR fueron 3 minutos a 94 °C, 35 ciclos (1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 65 °C, 1 minuto y 30 segundos a 72 °C), y 5 minutos a 72 °C, finalmente los productos se conservaron a 4 °C para analizarse en gel de agarosa al 1% teñido con GelRed.

El producto de PCR obtenido se purificó por columna QIAquick™ PCR Purification Kit (QIAGEN) y se cuantificó por espectrofotometría midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 260 nm; también a la par se determinó la pureza de las muestras por la relación de absorbancias 260/280 nm. Todas las cuantificaciones se hicieron por duplicado utilizando 1 µl de muestra en un espectrofotómetro de gota Nanodrop ND1000™ (Thermo Scientific).

Tabla 1. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación y reamplificación de los cDNA de las subunidades de LDH. En subrayado se marcan los sitios reconocidos por las enzimas de restricción

Oligonucleótido	T _m (°C)	Secuencia (5' – 3')
LDHMinFw	59.5	ATGGCCTCTGTTCTGAAATG
LDH2rtRv	59.5	CATTGTTGCATCACGCGCC
LDHNheIFw	68.5	AATAATGCTAGCATGGCCTCTGTTCTG
LDHXhoIRv	70.1	AGTAATCTCGAGGAACTGAATTCCGGCC

Preparación del Vector de Sobreexpresión pTXB1

En paralelo a la síntesis y amplificación del cDNA, se trabajó en la preparación de DNA plasmídico del vector de sobreexpresión pTXB1 usado en el sistema IMPACT (New England Biolabs) y que contiene el gen que confiere resistencia a ampicilina, además del sitio múltiple de clonación con los sitios de restricción para las enzimas *NheI* y *XhoI*.

Para la producción del plásmido se utilizó **pTXB1** clonado en células *E. coli* TOP10 (Invitrogen) que estaban almacenadas a -80 °C. Las bacterias se inocularon por asada en 5 ml de caldo Luria Broth (LB) adicionado con 5 µl de ampicilina (100 mg/ml) y se incubaron toda la noche a 37 °C con agitación constante a 200 rpm para promover la distribución uniforme de los nutrientes y la oxigenación en el medio de cultivo. Las bacterias se colectaron por centrifugación para formar un pellet celular, para esto se distribuyó el cultivo en alícuotas de 1 a 1.5 ml y se centrifugó a 11,000 rpm por 5 minutos (Centrifuga 5415D™, Eppendorf).

El plásmido se aisló del pellet bacteriano por el método de lisis alcalina (Sambrook y Russell, 2001), resuspendiéndose en 100 µl de TE (Tris HCl, 10 mM, EDTA 1 mM). La purificación se realizó agregando un volumen igual de fenol (equilibrado con Tris, pH 7.9), se agitó de 10 a 15 segundos y se transfirió la fase acuosa superior a tubos nuevos, se agregó un volumen de 100 µl de cloroformo y se mezcló de 10 a 15 segundos. Esta

mezcla se centrifugó y nuevamente se transfirió la fase acuosa a tubos nuevos a los que se les añadió 200 µl de etanol absoluto y 10 µl de acetato de sodio 3 M (pH 5.2), se agitó de 10 a 15 segundos, y se centrifugó a 13,000 rpm por 20 minutos. El sobrenadante se decantó y se lavó el pellet residual en el tubo con etanol frío al 80%, centrifugándose a 13,000 rpm por 15 minutos, para finalmente decantar el contenido del tubo y secar el pellet por vacío (DNA 110 Speed Vac, SAVANT). El pellet seco se resuspendió en 10 µl de buffer TE, y se cuantificó por duplicado a 260 nm.

Construcción del Plásmido Recombinante

Para la construcción del plásmido recombinante se utilizaron los cDNA de las subunidades reamplificados con los oligonucleótidos modificados con los sitios de restricción para las enzimas de restricción *NheI* y *XhoI* y el vector de sobreexpresión pTXB1. El primer paso consistió en la digestión de los cDNA y vector pTXB1 por las enzimas *NheI* y *XhoI*. Para ello se hicieron reacciones de 20 µl que alcanzaron un volumen final de 25 µl. El proceso de digestión se hizo en dos etapas secuenciales en un mismo tubo en condiciones diferentes de concentración del buffer de reacción como lo recomienda el fabricante.

En un microtubo se mezclaron 1 µl del plásmido pTXB1 (1 µg), 1 µl de la enzima *NheI* (10 u/µl), 2 µl del buffer Tango 10X (Fermentas), y se aforó a 20 µl con agua deionizada estéril y la mezcla se incubó a 37 °C por 1 hora para llevar a cabo la primer digestión. Después se añadieron 3 µl de buffer Tango 10X, 1 µl de la enzima *XhoI* (10 u/µl) y 1 µl de agua deionizada estéril completando así 25 µl para una segunda reacción de digestión que también se incubó a 37 °C por 1 hora. La digestión de los fragmentos de PCR se realizó con 6.5 µl del DNA (80 ng/µl) de branquias y músculo por separado, 1 µl de la enzima *NheI* (10 u/µl), 2 µl de buffer Tango 10X, y se ajustó a 20 µl con 10 µl de agua de ionizada estéril, se incubó a 37 °C por 1 hora, después de lo cual se agregaron 3 µl de buffer Tango 10X, 1 µl de la enzima *XhoI* y 1 µl de agua estéril, la mezcla se incubó a 37 °C por 1 hora. Al término de la digestión doble se mezclaron los tubos iguales y se

analizaron por migración diferenciada con las mismas muestras sin digerir como control por electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con GelRed.

Después de la digestión se procedió a la ligación de los fragmentos digeridos al vector de sobreexpresión pTXB1 para formar los plásmidos recombinantes que contuvieran dentro de sus estructuras la secuencia codificante de la LDH. Anticipadamente se purificaron las reacciones de digestión por el método de fenol-cloroformo resuspendiendo en un volumen final de 20 μ l de agua deionizada estéril, en lugar de 10 μ l de buffer TE como dicta el protocolo. La ligación se hizo en base al sistema de clonación pGEMTM-T Easy Vector Systems (Promega) con ligeras modificaciones. La mezcla estuvo compuesta por 1 μ l del vector pTXB1 (80 ng), 50 ng de inserto (8 μ l de del fragmento derivado del cDNA de branquias; 3 μ l de cDNA de músculo). Cabe mencionar que se hicieron reacciones de ligación por separado para los fragmentos obtenidos de los cDNAs de branquias (LDH1) y músculo (LDH2); 1 μ l de T4 DNA ligasa (3 weiss u/ μ l), y se duplicó el volumen al final con buffer de ligación rápida T4 DNA ligasa, es decir, si al mezclar los componentes previos alcanzábamos un volumen de 10 μ l se agregarían otros 10 μ l pero en este caso de buffer de la enzima, y se incubó a 4 °C toda la noche. Posteriormente a la ligación, se transformaron células químicamente competentes de *E. coli* TOP10 siguiendo también las indicaciones del sistema pGEM-T Easy Vector Systems con ligeras modificaciones. Para cada transformación se utilizó un vial de 25 μ l de células competentes al que se adicionó el plásmido recombinante previamente ligado (20 μ l ligación de branquias; 10 μ l ligación de músculo), se incubó en hielo por 15 minutos, y se calentó a 42 °C por 15 segundos. Las células fueron colocadas en hielo y se agregaron 250 μ l de medio S.O.C. (extracto de levadura 0.5%, triptona 2%, cloruro de sodio 10 mM, cloruro de potasio 2.5 mM, cloruro de magnesio 10 mM, sulfato de magnesio 10 mM, glucosa 20 mM) a temperatura ambiente, y se incubó el vial en posición horizontal a 37 °C por 1 hora y 30 minutos a 200 rpm.

El producto de la transformación se sembró por dispersión sobre placas Petri conteniendo agar LB con ampicilina (100 μ g/ml) por duplicado en volúmenes de 100 y 200 μ l y se incubaron a 37 °C de 12 a 16 horas hasta la aparición de colonias. Las colonias o clones recombinantes potenciales se analizaron por PCR convencional

juntando 5 colonias y posteriormente aquellas que resultaron positivas se analizaron de manera individual. Para hacer los PCRs de colonia se prepararon viales con 75 μ l de agua estéril en los cuales se resuspendió una colonia seleccionada al azar, cada colonia fue tocada con un palillo de madera estéril creando una réplica en una placa nueva claramente identificada, posteriormente de cada 5 viales de colonias resuspendidas se tomaron 10 μ l y se mezclaron en un tubo nuevo. Para la reacción de PCR se tomó de cada conjunto 2 μ l como DNA molde, 1 μ l de oligonucleótido sentido T7 promotor (10 μ M), 1 μ l de oligonucleótido antisentido T7 terminador (10 μ M) y 22 μ l de *Taq* DNA polimerasa Platinum Supermix. Las secuencias de los oligonucleótidos se especifican en la tabla 2. Las condiciones de amplificación fueron 10 minutos a 94 °C, 35 ciclos (1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 55 °C, 1 minuto y 30 segundos a 72 °C), 5 minutos a 72 °C y se conservó a 4 °C. El producto de PCR se analizó en gel de agarosa al 1% teñido con GelRed.

Secuenciación de Clones Positivos

Las colonias que resultaron positivas se sembraron de las placas réplica en 5 ml de caldo LB con 5 μ l de ampicilina (100 mg/ml), y se incubaron a 37 °C a 200 rpm de 12 a 16 horas. De estos cultivos se colectaron las células por centrifugación, se aisló el DNA y se purificó el plásmido recombinante por QIAprep™ Spin Miniprep kit (QIAGEN). Los clones fueron secuenciados por el método de dideoxidos (Sanger et al., 1977) en el Laboratory of Genomic Analysis and Technology Core de la Universidad de Arizona, Tucson, Arizona, USA, utilizando distintos oligonucleótidos (Tabla 2).

Tabla 2. Lista de oligonucleótidos utilizados para la identificación y secuenciación de los constructos plasmídicos pTXB1 – cDNA de LDH

Oligonucleótido	Tm (°C)	Secuencia (5' – 3')
T7 Promotor	54.3	TAATACGACTCACTATAGGG
T7 Terminador	57.5	GCTAGTTATTGCTCAGCGC
Mx Intein II Rv	62.5	GATTGCCATGCCGGTCAAGG
LDH BL3 Fw	58.0	GAGTCTCGTTTGTCCCTTGT
LDH B2 Rv	58.0	AGGAGGTGTATCCCTTCAGT

Las secuencias nucleotídicas provenientes de los clones positivo se analizaron e identificaron por medio del algoritmo BLASTn del National Center for Biotechnology Information Bethesda, MD (<http://ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) (Altschul et al., 1990) por comparación con las previamente reportadas en la base de datos del Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) con número de acceso LDH1 (HQ433260) y LDH2 (HQ433259) (Soñanez-Organis et al., 2012). Además, se realizó una prueba de alineación múltiple buscando diferencias en las secuencias nucleotídicas de los constructos que pudieran afectar durante la sobreexpresión modificando la proteína derivada, utilizando el algoritmo CLUSTALW2 del European Bioinformatics Institute (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) (Thompson et al., 1994).

Sobreexpresión de las Subunidades LDH1 y LDH2

Para la sobreexpresión se utilizó la cepa de *E. coli* ER2566 (New England Biolabs) que se transformó previamente con los plásmidos recombinantes de los clones 60 (LDH1) y 19 (LDH2). En la transformación se usaron 50 ng del plásmido recombinante de cada subunidad con 20 µl células químicamente competentes que se sembraron en placas con LB conteniendo 100 µg/ml de ampicilina. Las colonias resultantes se usaron para hacer hicieron 2 preinóculos, el primero de 5 ml de LB (con ampicilan), que se incubó toda la noche a 37 °C con agitación de 200 rpm. De este cultivo se tomó 625 µl como preinóculo para un segundo cultivo de 25 ml que se incubó también a 37 °C y 200 rpm

hasta alcanzar la densidad óptica (OD) de 0.5 a una longitud de onda de 600 nm, condición necesaria para utilizarlo como inóculo final. Por último se agregaron los 25 ml en 1000 ml de LB con ampicilina y se incubó hasta alcanzar la OD₆₀₀ de 0.5, tiempo en el que se indujo añadiendo 200 µl de IPTG 1 M para una concentración final de 0.2 mM, se incubó por 2 h y se colectaron las bacterias por centrifugación a 5000 Xg a 4 °C por 15 minutos como pellets celulares (Sorvall™ Centrifuge RC 5C Plus, Kendro). Estos pellets se almacenaron a -80°C hasta la etapa de purificación. Para el análisis de la inducción se tomaron muestras de las fases no inducidas (sin IPTG) e inducidas (con IPTG) al tiempo límite de 2 horas, se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 13% (Laemmli, 1970), 15 mA (PowerPac3000™, Biorad) y temperatura ambiente. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie al 0.025%.

Purificación por Cromatografía de Afinidad

El método de purificación usado fue el recomendado en el protocolo estándar del sistema IMPACT, e inicia desde el tratamiento de las muestras congeladas de los pellets bacterianos. En el caso de la LDH2 se tomaron 2 pellets (provenientes de 250 ml de cultivo cada uno) y se resuspendieron en 35 ml de buffer de columna (Tris-HCl 20 mM, NaCl 500 mM, EDTA 1 mM, pH 8.5) con 200 µl de fluoruro de metilfenilsulfonilo (PMSF) 50 mM como inhibidor de proteasas. Las muestras se homogenizaron manteniéndose en hielo usando sonicación por pulsos con punta gruesa para macrovolúmenes (Sonifier™ S-450^a, Branson) para lisar las bacterias. En total se usaron 4 pulsos de 10 segundos cada uno con tiempos intermedios de 10 a 15 segundos de descanso manteniendo siempre el homogenizado en hielo. La mezcla sonicada se centrifugó a 15,000 Xg por 30 minutos a 4 °C (Avanti™ 30, Beckman Coulter), y se colectó la fase soluble o clarificado de los tubos para la etapa de purificación. Para la LDH1 se resuspendió un pellet único proveniente de 500 ml de cultivo bacteriano en 50 ml de buffer de columna y se agregó 500 µl de PMSF (50 mM), se sometió a 5 pulsos de 10 segundos, y se centrifugó a 11, 000 rpm por 5 minutos a 4 °C (Biofuge Pico™, Heraeus), para finalmente recuperar la fase soluble para la cromatografía.

Para la purificación se utilizó una columna de plástico en un soporte universal con capacidad de 6 ml, la cual se empacó por gravedad con quitina inmovilizada (New England Biolabs). La columna se conectó a una bomba peristáltica de flujo variable (Peristaltic Pump P-1, Pharmacia) y se lavó a flujo constante con 10 volúmenes de buffer de columna (60 ml) a razón de 1 ml/min para equilibrar el sistema. Posteriormente se cargó el clarificado a la columna con un flujo de 0.5 ml/min, pasando el volumen total del mismo en 2 ocasiones a través de la matriz en un sistema de recirculación cerrado. La columna se lavó con 20 volúmenes (120 ml) de buffer de columna con un flujo de 2 ml/min. Para separar la LDH se lavó la columna añadiendo 18 ml de buffer de corte (Tris-HCL 20 mM, NaCl 500 mM, EDTA 1 mM, DTT 50 mM, pH 8.5) que se cargó a la columna a velocidad de 1 ml/min y se incubó de 12 a 16 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se procedió a eluir la proteína con el buffer de columna antes descrito y se colectaron fracciones de 2 ml.

La proteína se cuantificó por el método de Bradford (Bradford, 1976) adaptado a microplaca (96 Well EIA/RIA Easy Wash™, Corning) mezclando 20 µl de muestra con 200 µl del reactivo Bradford (0.01% Coomassie Brilliant Blue G-250, 4.7% etanol, 8.5% H₃PO₄), se hicieron 5 replicas de cada muestra a 595 nm (Microplate Reader 680™, Biorad) y se usó seroalbúmina bovina como estándar para calcular la concentración de proteína en las muestras. Las determinaciones se hicieron al menos por triplicado.

La proteína se concentró por precipitación con ácido tricloroacético (TCA). Para ello se tomó 200 µl de cada fracción, se agregó 50 µl de TCA al 100%, posteriormente se incubó por 10 minutos a 4 °C, se centrifugó a 11,000 rpm por 5 minutos y se descartó el sobrenadante; los pellets se lavaron con 200 µl de acetona fría y se centrifugaron nuevamente a 11,000 rpm por 5 minutos, de nuevo se descartó el sobrenadante y se repitió éste último paso. Los pellets se secaron en bloque térmico (Select Heatblock VWR, Scientific Products) a 95 °C durante 5 a 10 minutos para eliminar la acetona, para cargar las muestras en el SDS-PAGE al 13% se añadieron 15 µl de buffer muestra 2X (Tris-HCl 126 mM, glicerol 20%, SDS 4%, azul de bromofenol 0.02%, pH 6.8) y se calentaron a 95 °C por 5 minutos. Las muestras así preparadas se analizaron en geles al

13%, corridos a 10 mA y temperatura ambiente. Estos geles se tiñeron con nitrato de plata (Schuchard et al., 2002).

La tinción con nitrato de plata se hizo incubando el gel en la solución fijadora (etanol 30%, ácido acético 10%) por 30 minutos, se pasó a la solución incubadora (etanol 30%, acetato de sodio 4.1%, tiosulfato de sodio 0.13%, glutaraldehído 0.52%) por 30 min y enseguida se lavó con agua deionizada por 5 minutos con agitación suave en tres ocasiones. Posteriormente se incubó con solución teñidora (etanol 20%, nitrato de plata 0.1%, formaldehído 0.02%) por 20 minutos, para después colocarlo en solución reveladora (etanol 20%, carbonato de sodio 2.5%, formaldehído 0.01%) y detectar las bandas producidas durante la tinción, finalmente la reacción se detuvo lavándolo con una última solución de EDTA 1.46%.

Zimogramas

La detección de la actividad enzimática de la LDH se hizo en geles nativos de poliacrilamida (Manchenko, 1994). Se cargaron 20 µl (0.1068 µg) de cada fracción eluída y se corrieron a 10 mA constantes y 4 °C. Al término de la corrida se incubó el gel a 37 °C por aproximadamente 1.5 hrs en la solución teñidora (60 ml de Tris-HCl 200 mM, pH 8; 12 ml L-Lactato 0.5 M, pH 8; 2.7 ml NAD⁺ 10 mg/ml; 6.7 ml de nitroazul de tetrazolio 1 mg/ml; 6.7 ml de metasulfato de fenazina 1 mg/ml), observándose bandas definidas de color azul oscuro. Para finalizar el análisis se lavó el gel con agua y se fijó con etanol al 50 %.

Ensayos de Actividad Enzimática

Los ensayos de actividad enzimáticos para la LDH se hicieron por espectrofotometría en base al método descrito por Worthington (1988) con las siguientes modificaciones. Se midió la oxidación del NADH por el decremento en la absorción a 340 nm (Cary 50™ UV-Vis, Varian) a 25 °C (Peltier™ PCB 1500, Varian) durante 3 minutos. La mezcla de reacción contenía 70 µl Tris-HCl 1 M, pH 7.6; 20 µl piruvato de sodio 100 mM, 22.7 µl

NADH 6.6 mM; 337.3 μ l de agua deionizada; la reacción se iniciaba al añadir 50 μ l de la enzima (0.267 μ g), en un volumen final de 0.5 ml. Cada determinación se hizo por duplicado. La actividad se expresó como μ moles de NAD⁺ producidos/min/mg proteína (U/mg proteína) (Worthington, 1988).

Análisis Cinético

Las constantes cinéticas se obtuvieron midiendo la velocidad inicial de la reacción variando la concentración de piruvato (0.015, 0.03, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4 mM) y manteniendo fija la concentración del NADH (0.1 mM); la actividad se expresa como actividad específica en μ moles/min/mg de proteína. Los datos de velocidad inicial se graficaron y ajustaron a la ecuación de Michaelis-Menten en el software Grafit™ V7 (Erithacus) para obtener K_m y V_{max} aparentes.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Síntesis de los cDNA de las Subunidades de la LDH

Para la producción de los constructos recombinantes de la LDH se obtuvo el cDNA a partir de los RNA totales que provenían de camarones sujetos a diferentes condiciones de oxígeno ambiental. Debido a que la LDH es una proteína tejido-específica se partió de muestras de RNA purificadas de branquias de camarones expuestos a hipoxia por 24 horas para obtener la LDH1 y músculo en condiciones de normoxia para obtener la LDH2. Una vez obtenido este material se procedió a la amplificación por PCR convencional utilizando oligonucleótidos específicos para los extremos de los transcritos, produciendo amplicones de 996 pares de bases (pb) que incluyen solo a la región codificante de 996 pb. Los fragmentos de dicha amplificación se muestran en la Figura 4 en un tamaño aproximado de 1000 pb.



Figura 4. Amplificación por PCR de los fragmentos correspondientes a las subunidades de lactato deshidrogenasa a partir de los cDNA sintetizados del RNA de branquias y músculo.

Clonación de los cDNA de las Subunidades LDH1 y LDH2

Los productos de la primera PCR se usaron como molde para una nueva amplificación con los oligonucleótidos modificados para formar los extremos cohesivos en las secuencias de los cDNA para las enzimas de restricción *NheI* y *XhoI*, y que posteriormente se ligarían al vector de sobreexpresión pTXB1 del sistema IMPACT. Esta reamplificación se muestra en la figura 5.

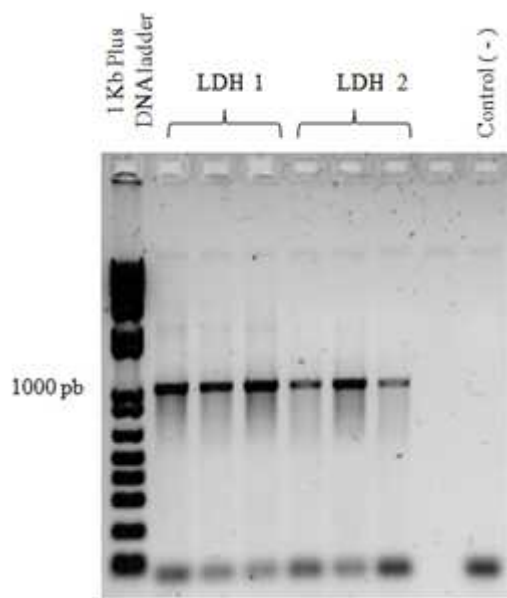


Figura 5. Reamplificación del cDNA de LDH1 y LDH2 con iniciadores específicos diseñados para la formación de extremos cohesivos.

Digestión de los Amplicones de LDH y Vector de Sobreexpresión pTXB1

Los amplicones que contenían los extremos con los sitios de restricción se digirieron junto con el vector pTXB1 con las enzimas de restricción *NheI* y *XhoI*, y se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1%. Los DNAs digeridos presentaron una clara diferenciación en su migración respecto a los controles sin digerir como muestra la Figura 6. El análisis del DNA digerido del vector es una sola banda que migra más retrasada comparada con el vector sin digerir, y por otro lado los fragmentos de la LDH se observan con una ligera diferencia en la posición al no digerido. Además el patrón de bandas obtenido muestra buena concentración y calidad del material.

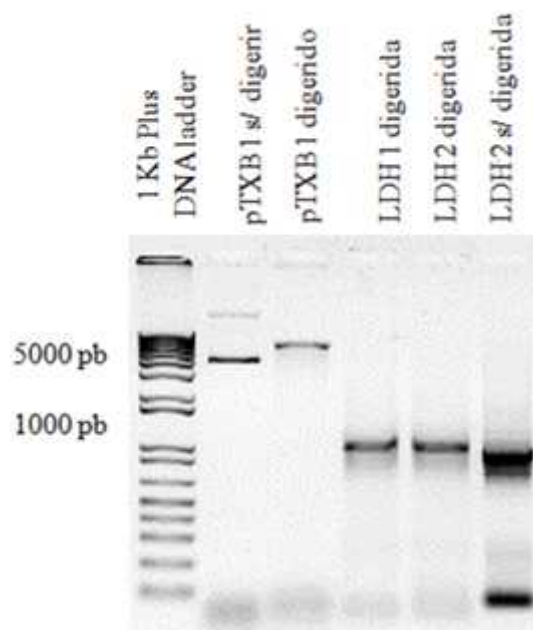


Figura 6. Análisis electroforético de las digestiones del vector pTXB1 y los amplicones LDH1 y LDH2 con las enzimas de restricción *NheI* y *XhoI*.

Construcción de los Plásmidos Recombinantes y Análisis de Colonias

El material digerido se purificó y se utilizó en la construcción de los plásmidos recombinantes. Para la ligación se incubó el vector pTXB1 linearizado con los fragmentos digeridos de la LDH y la enzima T4 DNA ligasa. La ligación se llevó a cabo por separado para los cDNAs de branquias y músculo, para evitar mezclas innecesarias de los tipos de subunidades de la LDH. Los plásmidos recombinantes se usaron para transformar células de *E. coli* TOP10 químicamente competentes. Las colonias resultantes se analizaron por PCR y se seleccionaron las que contenían el constructo de interés. De un total de 140 colonias seleccionadas al azar se obtuvieron 4 colonias positivas que contenían el inserto de la LDH y de esas se purificó el plásmido recombinante para su secuenciación (Figura 7).

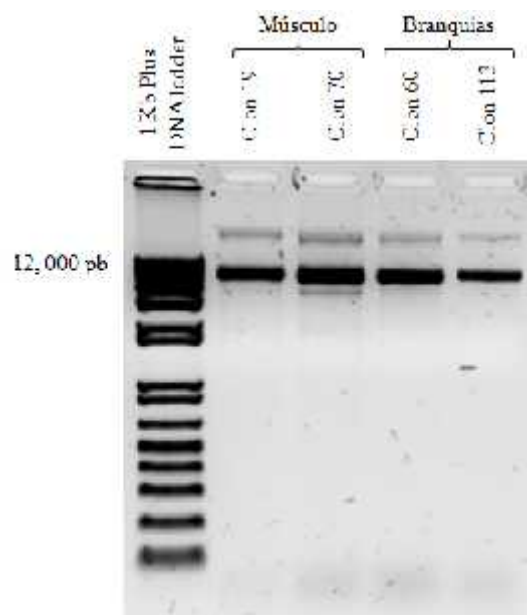


Figura 7. Clones positivos identificados mediante PCR de colonias que contenían los plásmidos con el cDNA de LDH de branquias y músculo.

Secuenciación de los Constructos Plasmídicos

Cada uno de los clones se secuenció y analizó por comparación con las secuencias conocidas de LDH (Soñanez-Organis et al., 2012), mediante alineamientos múltiples para encontrar las posibles diferencias que pudieron ocurrir en el proceso de amplificación, reamplificación y multiplicación del material genético (Figuras 8 y 9). Las secuencias de LDH1 y LDH2 difieren sólo por un fragmento de 42 aminoácidos que es generado por corte y empalme mutuamente excluyente de los exones 5 y 6 del gen de la LDH y que corresponden a la misma región de la proteína madura (Soñanez-Organis et al., 2012). Aunque solamente se obtuvieron 2 clones derivados del RNA de branquias y 2 del RNA de músculo, los clones aislados correspondieron a la expresión tejido-específica previamente reportada en branquias para LDH1 y en músculo para la LDH2 (Soñanez-Organis et al., 2012). Las secuencias determinadas se presentan en la figuras 8 y 9.

LDH1 ATGGCCTCTGTTCCCTGAAATGCTTATGGAGCAAATCCAGCCTCCCCTGACCACCTCAGGA 60
 CLON60 ATGGCCTCTGTTCCCTGAAATGCTTATGGAGCAAATCCAGCCTCCCCTGACCACCTCAGGA 60
 CLON113 ATGGCCTCTGTTCCCTGAAATGCTTATGGAGCAAATCCAGCCTCCCCTGACCACCTCAGGA 60

LDH1 GGCAAAGTGTCTGTGGTGGGTGTTGGCCAGCCGGAATGGCCTGCGCCTTCTCACTCCTG 120
 CLON60 GGCAAAGTGTCTGTGGTGGGTGTTGGCCAGGTGGGAATGGCCTGCGCCTTCTCACTCCTG 120
 CLON113 GGCAAAGTGTCTGTGGTGGGTGTTGGCCAGGTGGGAATGGCCTGCGCCTTCTCACTCCTG 120

LDH1 ACACAGCACATCTGCTCTGAGCTGGCCCTGGTTGATGTTGCTGCTGACAAGCTGCGTGGA 180
 CLON60 ACCCAGCACATCTGCTCTGAGCTGGCCCTGGTTGATGTTGCTGCTGACAAGCTGCGTGGA 180
 CLON113 ACCCAGCACATCTGCTCTGAGCTGGCCCTGGTTGATGTTGCTGCTGACAAGCTGCGTGGA 180

LDH1 GAGATGATGGATCTCCAGCACGGACTTACATTCCCTGAGGAACGTGAAGATTGATGCAAAC 240
 CLON60 GAGATGATGGATCTCCAGCACGGACTTACATTCCCTGAGGAACGTGAAGATTGATGCAAAC 240
 CLON113 GAGATGATGGATCTCCAGCACGGACTTACATTCCCTGAGGAACGTGAAGATTGATGCAAAC 240

LDH1 ACCGATTATGCTGTGACAGCTGGCTCTCGTGTGTGCATTGTTACTGCTGGTGTCTCGTCAG 300
 CLON60 ACCGATTATGCTGTGACAGCTGGCTCTCGTGTGTGCATTGTTACTGCTGGTGTCTCGTCAG 300
 CLON113 ACCGATTATGCTGTGACAGCTGGCTCTCGTGTGTGCATTGTTACTGCTGGTGTCTCGTCAG 300

LDH1 AGGGAGGGAGAGTCTCGTTTGTCCCTTGTACAGCGCAACGTGGACATCTTCAAGGGCATG 360
 CLON60 AGGGAGGGAGAGTCTCGTTTGTCCCTTGTACAGCGCAACGTGGACATCTTCAAGGGCATG 360
 CLON113 AGGGAGGGAGAGTCTCGTTTGTCCCTTGTACAGCGCAACGTGGACATCTTCAAGGGCATG 360

LDH1 ATTCCCCAGCTGGTAAAGCATTCCCCTAACTGCATCCTCCTCATTGTGTCAAACCCAGTG 420
 CLON60 ATTCCCCAGCTGGTAAAGCATTCCCCTAACTGCATCCTCCTCATTGTGTCAAACCCAGTG 420
 CLON113 ATTCCCCAGCTGGTAAAGCATTCCCCTAACTGCATCCTCCTCATTGTGTCAAACCCAGTG 420

LDH1 GATATCCTGACCTACGTTGCATGGAAACTGTCTGGCCTCCCCAAGCACCATGTGATCGGC 480
 CLON60 GATATCCTGACCTACGTTGCATGGAAACTGTCTGGCCTCCCCAAGCACCATGTGATCGGC 480
 CLON113 GATATCCTGACCTACGTTGCATGGAAACTGTCTGGCCTCCCCAAGCACCATGTGATCGGC 480

LDH1 TCAGGCACCAACCTGGACTCTGCCAGATTCCGCTTCCACCTGTCCCAGAAACTGAGTGTGTC 540
 CLON60 TCAGGCACCAACCTGGACTCTGCCAGATTCCGCTTCCACCTGTCCCAGAAACTGAGTGTGTC 540
 CLON113 TCAGGCACCAACCTGGACTCTGCCAGATTCCGCTTCCACCTGTCCCAGAAACTGAGTGTGTC 540

LDH1 GCTCCCTCGTCCACCCACGGATGGATCATTGGCGAGCATGGTGACTCCTCTGTACCTGTGTC 600
 CLON60 GCTCCCTCGTCCACCCACGGATGGATCATTGGCGAGCATGGTGACTCCTCTGTACCTGTGTC 600
 CLON113 GCTCCCTCGTCCACCCACGGATGGATCATTGGCGAGCATGGTGACTCCTCTGTACCTGTGTC 600

LDH1 TGGTCTGGCGTTAATGTTGCTGGTGTGCGTCTGCGTGACTTGAACCCAAAAGTGGGAAC 660
 CLON60 TGGTCTGGCGTTAATGTTGCTGGTGTGCGTCTGCGTGACTTGAACCCAAAAGTGGGAAC 660
 CLON113 TGGTCTGGCGTTAATGTTGCTGGTGTGCGTCTGCGTGACTTGAACCCAAAAGTGGGAAC 660

LDH1 CCAGAAGATCCTGAAAAGTATGATGAACTCCACAAAGATGTTGTGAACAGTGCATATGAG 720
 CLON60 CCAGAAGATCCTGAAAAGTATGATGAACTCCACAAAGATGTTGTGAACAGTGCATATGAG 720
 CLON113 CCAGAAGATCCTGAAAAGTATGATGAACTCCACAAAGATGTTGTGAACAGTGCATATGAG 720

LDH1 ATCATCAAACCTGAAGGGATACACCTCCTGGGCCATCGGTCTCTCTGTGCGCTCTCTGGTG 780
 CLON60 ATCATCAAACCTGAAGGGATACACCTCCTGGGCCATCGGTCTCTCTGTGCGCTCTCTGGTG 780
 CLON113 ATCATCAAACCTGAAGGGATACACCTCCTGGGCCATCGGTCTCTCTGTGCGCTCTCTGGTG 780

LDH1 TCATCTATCGTCAAGAACATGCGCGCCTGCTATGCTGTCTCTGTAGCTGTTTCAAGAATTAC 840
 CLON60 TCATCTATCGTCAAGAACATGCGCGCCTGCTATGCTGTCTCTGTAGCTGTTTCAAGAATTAC 840
 CLON113 TCATCTATCGTCAAGAACATGCGCGCCTGCTATGCTGTCTCTGTAGCTGTTTCAAGAATTAC 840

LDH1	CATGGTATCGACAAGGATGTGTTCCCTGAGCTTGCCTGTGGTCTTGGGTGAGAACGGTGTC	900
CLON60	CATGGTATCGACAAGGATGTGTTCCCTGAGCTTGCCTGTGGTCTTGGGTGAGAACGGTGTC	900
CLON113	CATGGTATCGACAAGGATGTGTTCCCTGAGCTTGCCTGTGGTCTTGGGTGAGAACGGTGTC	900
LDH1	ACTCATGTCATCAAGCAGACCCTAACAGAAGCTGAAATTGCTCAGCTGCAAAAAGTCTGCT	960
CLON60	ACTCATGTCATCAAGCAGACCCTAACAGAAGCTGAAATTGCTCAGCTGCAAAAAGTCTGCT	960
CLON113	ACTCATGTCATCAAGCAGACCCTAACAGAAGCTGAAATTGCTCAGCTGCAAAAAGTCTGCT	960
LDH1	AACACACTCTGGGACGTTTCAGGCCGGAATTCAGTTCTAA	999
CLON60	AACACACTCTGGGACGTTTCAGGCCGGAATTCAGTTCTAA	999
CLON113	AACACACTCTGGGACGTTTCAGGCCGGAATTCAGTTCTAA	999

Figura 8. Comparación de la secuencia nucleotídica de LDH1 reportada y los insertos de los clones derivados de branquias. Las bases que aparecen resaltadas son los cambios encontrados entre las secuencias.

LDH2 ATGGCCTCTGTTCCCTGAAATGCTTATGGAGCAAATCCAGCCTCCCCTGACCACCTCAGGA 60
 CLON19 ATGGCCTCTGTTCCCTGAAATGCTTATGGAGCAAATCCAGCCTCCCCTGACCACCTCAGGA 60
 CLON70 ATGGCCTCTGTTCCCTGAAATGCTTATGGAGCAAATCCAGCCTCCCCTGACCACCTCAGGA 60

LDH2 GGCAAAGTGTCTGTGGTGGGTGTTGGCCAGGTGGGAATGGCCTGCGCCTTCTCACTCCTG 120
 CLON19 GGCAAAGTGTCTGTGGTGGGTGTTGGCCAGGTGGGAATGGCCTGCGCCTTCTCACTCCTG 120
 CLON70 GGCAAAGTGTCTGTGGTGGGTGTTGGCCAGGTGGGAATGGCCTGCGCCTTCTCACTCCTG 120

LDH2 ACACAGCACATCTGCTCTGAGCTGGCCCTGGTTGATGTTGCTGCTGACAAGCTGCGTGGA 180
 CLON19 ACCGAGCACATCTGCTCTGAGCTGGCCCTGGTTGATGTTGCTGCTGACAAGCTGCGTGGA 180
 CLON70 ACCGAGCACATCTGCTCTGAGCTGGCCCTGGTTGATGTTGCTGCTGACAAGCTGCGTGGA 180

LDH2 GAGATGATGGATCTCCAGCATGGACTTACATTCCCTGAGGAACGTGAAGATTGATGCAAAC 240
 CLON19 GAGATGATGGATCTCCAGCATGGACTTACATTCCCTGAGGAACGTGAAGATTGATGCAAAC 240
 CLON70 GAGATGATGGATCTCCAGCATGGACTTACATTCCCTGAGGAACGTGAAGATTGATGCAAAC 240

LDH2 ACCGATTATGCTGTGACAGCTGGCTCTCGTGTGTGCATTGTTACTGCTGGTGCTCGTCAG 300
 CLON19 ACCGATTATGCTGTGACAGCTGGCTCTCGTGTGTGCATTGTTACTGCTGGTGCTCGTCAG 300
 CLON70 ACCGATTATGCTGTGACAGCTGGCTCTCGTGTGTGCATTGTTACTGCTGGTGCTCGTCAG 300

LDH2 AGGGAGGGAGAGTCTCGTTTGTCCCTTGTACAGCGCAACGTGGACATCTTCAAGGGCATG 360
 CLON19 AGGGAGGGAGAGTCTCGTTTGTCCCTTGTACAGCGCAACGTGGACATCTTCAAGGGCATG 360
 CLON70 AGGGAGGGAGAGTCTCGTTTGTCCCTTGTACAGCGCAACGTGGACATCTTCAAGGGCATG 360

LDH2 ATTCCCCAGCTGGTAAAGCATTCCCCTAACTGCATCCTCCTCATTGTGTCAAACCCAGTG 420
 CLON19 ATTCCCCAGCTGGTAAAGCATTCCACCTAACTGCATCCTCCTCATTGTGTCAAACCCAGTG 420
 CLON70 ATTCCCCAGCTGGTAAAGCATTCCACCTAACTGCATCCTCCTCATTGTGTCAAACCCAGTG 420

LDH2 GATATCCTGACCTACGTTGCATGGAAACTATCTGGCCTCCCCAAGCACCATGTGATCGGC 480
 CLON19 GATATCCTGACCTACGTTGCATGGAAACTATCTGGCCTCCCCAAGCACCATGTGATCGGC 480
 CLON70 GATATCCTGACCTACGTTGCATGGAAACTATCTGGCCTCCCCAAGCACCATGTGATCGGC 480

LDH2 TCAGGCACCAACCTGGACTCTGCCAGATTCCGCTTCCACCTGTCCCAGAAACTGAGTGTC 540
 CLON19 TCAGGCACCAACCTGGACTCTGCCAGATTCCGCTTCCACCTGTCCCAGAAACTGAGTGTC 540
 CLON70 TCAGGCACCAACCTGGACTCTGCCAGATTCCGCTTCCACCTGTCCCAGAAACTGAGTGTC 540

LDH2 GCTCCCTCATCCACCCACGGATGGATCATTGGCGAGCATGGTGACTCCTCTGTACCTGTC 600
 CLON19 GCTCCCTCATCCACCCACGGATGGATCATTGGCGAGCATGGTGACTCCTCTGTACCTGTC 600
 CLON70 GCTCCCTCATCCACCCACGGATGGATCATTGGCGAGCATGGTGACTCCTCTGTACCTGTC 600

LDH2 TGGTCTGGTGTAAATGTTGCTGGTGTGCGTCTGCGTGACTTGAACCCAAAAGTGGGAAC 660
 CLON19 TGGTCTGGTGTAAATGTTGCTGGTGTGCGTCTGCGTGACTTGAACCCAAAAGTGGGAAC 660
 CLON70 TGGTCTGGTGTAAATGTTGCTGGTGTGCGTCTGCGTGACTTGAACCCAAAAGTGGGAAC 660

LDH2 CCAGAAGATCCTGAAAAGTATGATGAACTCCACAAAGATGTTGTGAACAGTGCTTATGAG 720
 CLON19 CCAGAAGATCCTGAAAAGTATGATGAACTCCACAAAGATGTTGTGAACAGTGCTTATGAG 720
 CLON70 CCAGAAGATCCTGAAAAGTATGATGAACTCCACAAAGATGTTGTGAACAGTGCTTATGAG 720

LDH2 GTGATCAAGATGAAGGGATACACTTCATGGGCCATTGGAACCTTCATGTGCTGTTCTAACC 780
 CLON19 GTGATCAAGATGAAGGGATACACTTCATGGGCCATTGGAACCTTCATGTGCTGTTCTAACC 780
 CLON70 GTGATCAAGATGAAGGGATACACTTCATGGGCCATTGGAACCTTCATGTGCTGTTCTAACC 780

LDH2	AGGGCCATTCTCACGAACCAACGTACTGTTTACGCCGTGCTACAAGTGTACAGAATTAC	840
CLON19	AGGGCCATTCTCACGAACCAACGTACTGTTTACGCCGTGCTACAAGTGTACAGAATTAC	840
CLON70	AGGGCCATTCTCACGAACCAACGTACTGTTTACGCCGTG C CTACAAGTGTACAGAATTAC	840
LDH2	CATGGTATCGACAAGGATGTGTTCCCTGAGCTTGCCTGTGGTCTTGGGTGAGAACGGTGTC	900
CLON19	CATGGTATCGACAAGGATGTGTTCCCTGAGCTTGCCTGTGGTCTTGGGTGAGAACGGTGTC	900
CLON70	CATGGTATCGACAAGGATGTGTTCCCTGAGCTTGCCTGTGGTCTTGGGTGAGAACGGTGTC	900
LDH2	ACTCATGTCATCAAGCAGACCCTAACAGAAGCTGAAATTGCTCAGCTGCAAAAAGTCTGCT	960
CLON19	ACTCATGTCATCAAGCAGACCCTAACAGAAGCTGAAATTGCTCAGCTGCAAAAAGTCTGCT	960
CLON70	ACTCATGTCATCAAGCAGACCCTAACAGAAGCTGAAATTGCTCAGCTGCAAAAAGTCTGCT	960
LDH2	AACACACTCTGGGATGTTTCAGGCCGGAATTCAGTTCTAA	999
CLON19	AACACACTCTGGGA C GTTTCAGGCCGGAATTCAGTTCTAA	999
CLON70	AACACACTCTGGGATGTTTCAGGCCGGAATTCAGTTCTAA	999

Figura 9. Comparación de la secuencia de LDH2 reportada y los insertos de los clones correspondientes a músculo. Las bases resaltadas son los cambios encontrados entre las secuencias.

En total se detectaron 4 cambios para el clon 60 en las posiciones 123, 201, 549 y 609 de la secuencia nucleotídica y para el clon113 se encontraron 5 en las posiciones 123, 201, 474, 549 y 609, ambos corresponden a la subunidad LDH1. Para los clones identificados como la subunidad LDH2 se detectaron 6 cambios en el clon19 en las posiciones 123, 384, 408, 417, 450 y 975, y 4 más en el clon70 en las posiciones 123, 384, 535 y 820.

Una vez verificada la identidad de los clones, se obtuvieron las secuencias deducidas de aminoácidos para comparar la estructura primaria de las proteínas (Figuras 10 y 11). Las secuencias provenientes de los clones 60 y 113 presentaron 100% de identidad en relación a la LDH1 a pesar de los cambios en las secuencias de bases, lo que indica que podrían ser mutaciones silenciosas generadas durante el manejo de los materiales o corresponder a polimorfismos naturales en el gen de la LDH entre camarones individuales que no repercuten en las proteínas. Por otro lado, en el clon70 proveniente de músculo y que corresponde a la subunidad LDH2, se detectaron dos cambios de aminoácidos en las posiciones 179 de serina por glicina y 274 de serina por prolina, estos aminoácidos se encontraban en el exón 3 y 5, de los cuales éste último se intercambia durante el proceso de corte y empalme alternativo en la expresión natural de la proteína en músculo principalmente (Soñanez-Organis et al., 2012). En el clon19 no se presentó ninguna diferencia con un 100% de identidad.

LDH1 MASVPEMLMEQIQPPLTTSGGKVSVVGQVGMACAFSLLTQHICSELALVDVAADKLRG 60
 Clon60 MASVPEMLMEQIQPPLTTSGGKVSVVGQVGMACAFSLLTQHICSELALVDVAADKLRG 60
 Clon113 MASVPEMLMEQIQPPLTTSGGKVSVVGQVGMACAFSLLTQHICSELALVDVAADKLRG 60

LDH1 EMDLQHGLTFLRNVKIDANTDYAVTAGSRVCIVTAGARQREGESRSLVQRNVDIFKGM 120
 Clon60 EMDLQHGLTFLRNVKIDANTDYAVTAGSRVCIVTAGARQREGESRSLVQRNVDIFKGM 120
 Clon113 EMDLQHGLTFLRNVKIDANTDYAVTAGSRVCIVTAGARQREGESRSLVQRNVDIFKGM 120

LDH1 IPQLVKHSPNCILLIVSNPVDILTYVAWKLSGLPKHHVIGSGTNLDSARFRFHLSQKLSV 180
 Clon60 IPQLVKHSPNCILLIVSNPVDILTYVAWKLSGLPKHHVIGSGTNLDSARFRFHLSQKLSV 180
 Clon113 IPQLVKHSPNCILLIVSNPVDILTYVAWKLSGLPKHHVIGSGTNLDSARFRFHLSQKLSV 180

LDH1 APSSTHGWIIGEHDSSVPVWSGVNVAGVRLRDLNPKVGTPEDEPEKYDELHKDVVNSAYE 240
 Clon60 APSSTHGWIIGEHDSSVPVWSGVNVAGVRLRDLNPKVGTPEDEPEKYDELHKDVVNSAYE 240
 Clon113 APSSTHGWIIGEHDSSVPVWSGVNVAGVRLRDLNPKVGTPEDEPEKYDELHKDVVNSAYE 240

LDH1 I IKLKGYSWAIGLSVASLVSSIVKNMRACYAVSVAVQNYHGIDKDVFLSLPVVLGENGV 300
 Clon60 I IKLKGYSWAIGLSVASLVSSIVKNMRACYAVSVAVQNYHGIDKDVFLSLPVVLGENGV 300
 Clon113 I IKLKGYSWAIGLSVASLVSSIVKNMRACYAVSVAVQNYHGIDKDVFLSLPVVLGENGV 300

LDH1 THVIKQTLTEAEIAQLQKSANTLWDVQAGIQF 332
 Clon60 THVIKQTLTEAEIAQLQKSANTLWDVQAGIQF 332
 Clon113 THVIKQTLTEAEIAQLQKSANTLWDVQAGIQF 332

Figura 10. Comparación de las secuencias aminoacídicas de LDH1 de *L. vannamei* con las obtenidas de los clones recombinantes con cDNA proveniente de branquias.

LDH2	MASVPEMLMEQIQPPLTTSGGKVSVVGQVGMACAFSLLTQHICSELALVDVAADKLRG	60
Clon19	MASVPEMLMEQIQPPLTTSGGKVSVVGQVGMACAFSLLTQHICSELALVDVAADKLRG	60
Clon70	MASVPEMLMEQIQPPLTTSGGKVSVVGQVGMACAFSLLTQHICSELALVDVAADKLRG	60
LDH2	EMMDLQHGLTFLRNVKIDANTDYAVTAGSRVCIVTAGARQREGESRSLVQRNVDIFKGM	120
Clon19	EMMDLQHGLTFLRNVKIDANTDYAVTAGSRVCIVTAGARQREGESRSLVQRNVDIFKGM	120
Clon70	EMMDLQHGLTFLRNVKIDANTDYAVTAGSRVCIVTAGARQREGESRSLVQRNVDIFKGM	120
LDH2	IPQLVKHSPNCILLIVSNPVDILTYVAKLSGLPKHHVIGSGTNLDSARFRFHLSQKLSV	180
Clon19	IPQLVKHSPNCILLIVSNPVDILTYVAKLSGLPKHHVIGSGTNLDSARFRFHLSQKLSV	180
Clon70	IPQLVKHSPNCILLIVSNPVDILTYVAKLSGLPKHHVIGSGTNLDSARFRFHLSQKLSV	180
LDH2	APSSTHGWIIGEHDSSVPVWSGVNVAGVRLRDLNPKVGTPEDEPEKYDELHKDVVNSAYE	240
Clon19	APSSTHGWIIGEHDSSVPVWSGVNVAGVRLRDLNPKVGTPEDEPEKYDELHKDVVNSAYE	240
Clon70	APSSTHGWIIGEHDSSVPVWSGVNVAGVRLRDLNPKVGTPEDEPEKYDELHKDVVNSAYE	240
LDH2	VIKMKGYTSWAIGTSCAVLTRAILTNQRTVYAVSTSVQNYHGIDKDVFLSLPVVLGENGV	300
Clon19	VIKMKGYTSWAIGTSCAVLTRAILTNQRTVYAVSTSVQNYHGIDKDVFLSLPVVLGENGV	300
Clon70	VIKMKGYTSWAIGTSCAVLTRAILTNQRTVYAVPTSVQNYHGIDKDVFLSLPVVLGENGV	300
LDH2	THVIKQTLTEAEIAQLQKSANTLWDVQAGIQF	332
Clon19	THVIKQTLTEAEIAQLQKSANTLWDVQAGIQF	332
Clon70	THVIKQTLTEAEIAQLQKSANTLWDVQAGIQF	332

Figura 11. Comparación de las secuencias aminoacídicas de LDH2 de *L. vannamei* con las secuencias de los clones recombinantes con cDNA proveniente de músculo. Los aminoácidos que se encuentran resaltados son los cambios encontrados entre las secuencias aminoacídicas.

Sobreexpresión de las subunidades de LDH en *E. coli* ER2566

Después de analizar los clones de LDH, se seleccionaron aquellos que no presentaban cambios en la estructura primaria de la proteína deducida. Los DNA plasmídicos recombinantes obtenidos de las colonias 60 (LDH1) y 19 (LDH2) se purificaron para transformar las células de *E. coli* ER2566 competentes para sobreexpresión y obtener las proteínas recombinantes. Se evaluaron diferentes condiciones de sobreexpresión a distintas concentraciones de IPTG (0.2, 0.4 y 0.8 mM), y tiempos de incubación de 2 y 4 horas, agregando el inductor cuando las bacterias se encontraba en su fase de crecimiento logarítmica (OD = 0.5 a 600 nm). La sobreexpresión de las subunidades se analizó por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes y reductoras (SDS-PAGE). En este análisis se obtuvo una proteína de fusión de aproximadamente 63 kDa formada por la LDH unida a una proteína unidora de quitina mediante una región denominada inteína que es autolisada en condiciones reductoras (50 mM DTT) en la purificación (Figura 12).

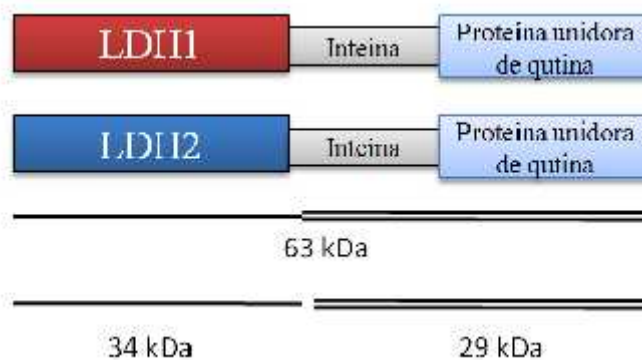


Figura 12. Representación de la proteína de fusión LDH-inteína-proteína unidora a quitina y las proteínas producidas después de la liberación por la inteína.

La sobreexpresión en bacteria fue exitosa. Se observó una buena sobreexpresión en la inducción con IPTG en las diferentes concentraciones y tiempos de incubación y no se aprecian diferencias significativas en la intensidad de las bandas en relación a la proteína inducida y las diferentes condiciones probadas como muestra la figura 13, por lo que se decidió usar 0.2 mM de IPTG para inducir la sobreexpresión de la enzima con un tiempo

de incubación de 2 horas. En un trabajo similar en el que se indujeron proteínas recombinantes de la LDH en peces damisela del Pacífico adaptados a diferentes temperaturas medioambientales, se usó IPTG al 0.1 mM con tiempo de incubación de 4 horas (Johns y Somero, 2004). Después de sobreexpresar las proteínas en las condiciones previamente descritas se colectaron las células bacterianas por centrifugación y se almacenaron a -80 °C hasta su uso en el proceso de purificación.

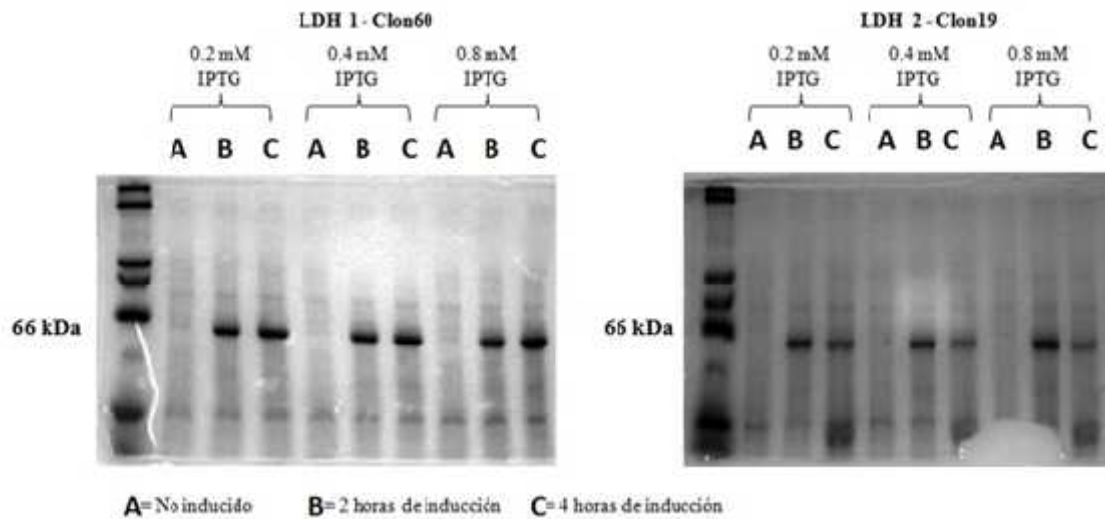


Figura 13. Electroforesis en SDS-PAGE al 13% de las proteínas inducidas por IPTG a diferentes tiempos de incubación.

Purificación de las Subunidades Recombinantes de la LDH

Los pellets celulares congelados se lisaron por sonicación en frío, se centrifugaron y se descartó el precipitado celular, conservando la fase soluble o clarificado que contenía la LDH recombinante. Posteriormente el clarificado se purificó por afinidad a quitina, reteniéndose así, la proteína de fusión con afinidad a quitina y lavando extensivamente para eliminar las proteínas no unidas a la quitina. El material retenido en la columna se incubó por 16 horas a temperatura ambiente en el buffer de corte con DTT. En la figura 14 se puede observar claramente la proteína de fusión (63 kDa) en el sonicado del pellet inducido e incubado con IPTG, también se observa la liberación de la LDH2 sola,

aunque no se observa esta banda con la misma nitidez en el clarificado, los lavados y la fracción de proteínas que no se unió a la matriz.

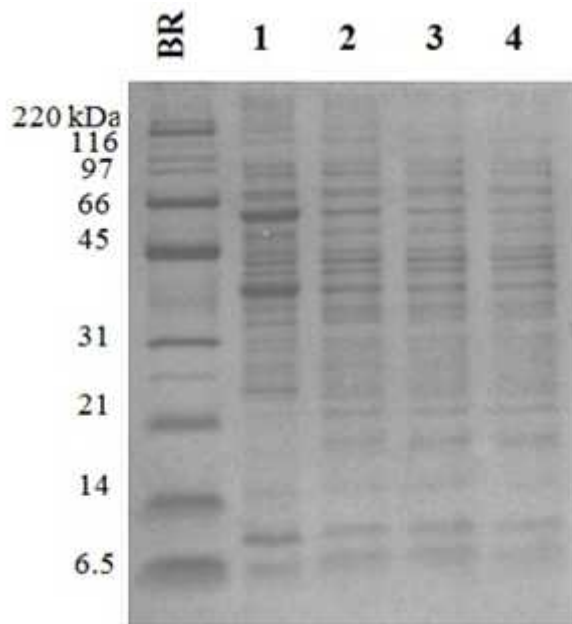


Figura 14. SDS-PAGE al 13% teñido con nitrato de plata que muestra las diferentes etapas del proceso de purificación de la LDH2. BR, marcador de peso molecular Broad Range; 1, pellet inducido sonicado; 2, clarificado; 3, lavados; 4, lo no retenido en la columna.

Concluido el tiempo de incubación se colectaron fracciones de 2 ml, en las que se determinó la actividad de LDH y las fracciones eluídas se analizaron por SDS-PAGE al 13% y se tiñeron con nitrato de plata para verificar su pureza. El resultado de la electroforesis fue una única banda en varios de los carriles en el tamaño esperado de 34 kDa; ésta única banda corresponde a la LDH2 pura. Aquellas fracciones que contenían solo la LDH2 pura se mezclaron con 20% de glicerol y almacenaron a -80°C para su conservación hasta los análisis cinéticos. La concentración de proteína en las fracciones fue baja, por lo que se concentró por precipitación con TCA 200 μl de cada fracción para analizar en gel (Figura 15).

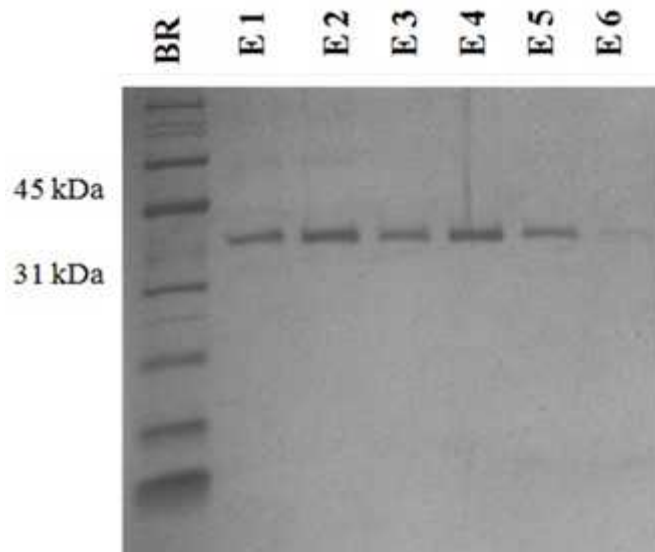


Figura 15. Electroforesis en SDS-PAGE al 13% teñido con nitrato de plata de las fracciones eluídas (E1 - E6) de la cromatografía después de incubar con DTT, concentradas y precipitadas por TCA.

En paralelo se intentó purificar la LDH1 logrando una correcta solubilización de la proteína de fusión en los procesos previos a la cromatografía. En la figura 16 se distingue claramente la banda inducida y que corresponde a la proteína de fusión (63 kDa), la cual se encuentra principalmente en la muestra inducida, en el pellet sonificado y el clarificado, no obstante no se logra observar en la fracción que no se adhiere a la columna con igual intensidad, y también se encuentra en la fracción eluída en el último paso de la purificación junto a una tenue banda de la LDH1 libre. Por lo tanto, a primera instancia podría suponerse que algo ocurre entre los procesos de lavado y corte, sin embargo, podría suponerse que la clave para solucionar el problema está en la etapa de corte ya que si se detectan las proteínas de fusión y LDH1 sola en el carril de la fracción eluída, en otras palabras, si se adhiere y también se libera.

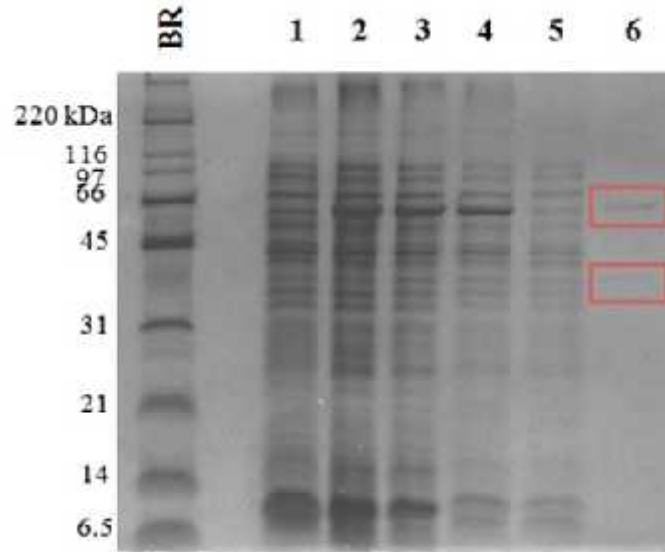


Figura 16. SDS-PAGE al 13% que muestra las diferentes etapas del proceso de purificación de la LDH1. En el recuadro rojo del último carril se señala las bandas que corresponden a la proteína de fusión y la LDH1 libre. Donde: BR, marcador de peso molecular Broad Range; 1, no inducido; 2, inducido con 0.2 mM IPTG por 2 horas; 3, pellet sonicado; 4, clarificado; 5, no retenido; 6, segunda fracción eluída precipitada de 1 ml por TCA.

Zimograma

Durante el proceso de purificación se analizó la actividad de la LDH2 cualitativamente en geles nativos que fueron incubados con lactato y NAD^+ para producir piruvato y NADH; en los geles se incluyó el marcador para proteínas nativas que contiene LDH comercial (Amersham, GE Healthcare Life Science) con un tamaño aproximado de 140 kDa. La posición de las bandas respecto al control positivo parece indicar que la LDH de camarón blanco *L. vannamei* es un homotetrámero como se ha reportado en muchos organismos vertebrados e invertebrados (Figura 17).

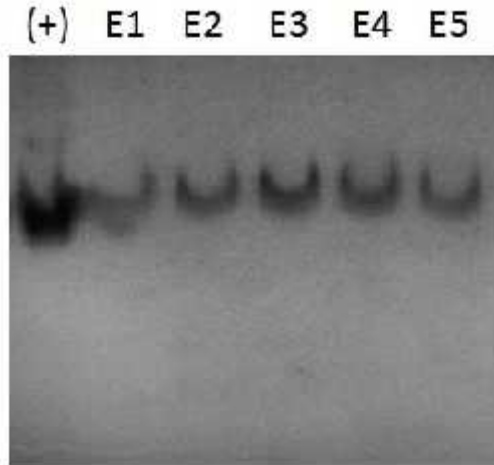


Figura 17. Zimograma de la LDH2. Control (+): banda que corresponde a la LDH comercial; E1, E2, E3, E4 y E5 son las fracciones eluidas de la cromatografía.

Ensayos de Actividad Enzimática y Análisis Cinético

La actividad específica de la LDH pura fue $1.51 \mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína. La LDH2 mostró una cinética Michaeliana al variar la concentración de los sustratos piruvato y NADH (Fig. 16), cinética encontrada en la gran mayoría de las LDHs. La enzima presentó una $K_{m_{ap}}$ de $0.1147 \pm 0.0171 \text{mM}$ y una $V_{max_{ap}} = 23.3 \pm 1.4 \mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ proteína. El dato de K_m aparente para piruvato de la LDH2 de *L. vannamei* es similar a los valores reportados para LDH de otras especies de crustáceos como el isópodo *Saduriaentomon* ($K_m=0.18 \text{mM}$), *Maganyctiphanes norvegica* (LDH-A, $K_m=0.18$; LDH-B, $K_m=0.36$), *Euphausia superba* ($K_m=0.18$) y especies de vertebrados como peces *Chromis caudalis* (LDH-A, $K_m=0.22 \text{mM}$) y conejos *Flandersgiants* (LDH-A, $K_m=0.25$; LDH-B, $K_m=0.12$) (Battellino et al., 1968; Johns y Somero, 2004; Mulkiewicz et al., 2000; Mulkiewicz et al., 2001). No obstante, cabe mencionar que existen variaciones de pH, temperatura y concentración de enzima principalmente en todos los ensayos de actividad reportados. El hecho de que la K_m de *L. vannamei* sea baja frente a piruvato podría indicar un comportamiento cinético parecido al de la subunidad H de vertebrados, sin embargo al no tener información sobre la K_m de la

LDH1 que sirva de comparativo como en otros casos reportados, no es posible asegurar dicha afirmación.

Otro dato importante fue que durante los ensayos cinéticos la LDH2 presentó una aparente inhibición por sustrato a concentraciones mayores de 400 μM de piruvato y 200 μM de NADH; este tipo de inhibición ya ha sido reportada en diferentes organismos siendo la subunidad H la más susceptible sobre todo a pH ácidos (Kühl y Schneppenheim, 1986; Pesce et al., 1967; Winer y Schwert, 1958). Respecto a los valores de V_{max} aparente si se observó un amplia diferencia de hasta 15 a 25 veces mayor con los otros organismos y la reportada para *L. vannamei*, aunque curiosamente este dato es más parecido al reportado en plantas como papa *Solanumtuberosum* ($V_{\text{max}}=6.5$) (Davies y Davies, 1972) y *Lactuca sativa* (Betsche, 1981), que cabe mencionar tienen valores de K_m más altos. Esto podría explicarse por dos razones; la primera es el diseño experimental de los ensayos especialmente en concentración de sustrato y tiempos de medición, ya que para piruvato variaban entre 0.5 y 10 mM *versus* 0.015 a 0.2 mM para la LDH2; la segunda podría deberse a que la actividad del camarón disminuye cuando se encuentra en condiciones de hipoxia entrando en un estado de letargo o poca actividad.

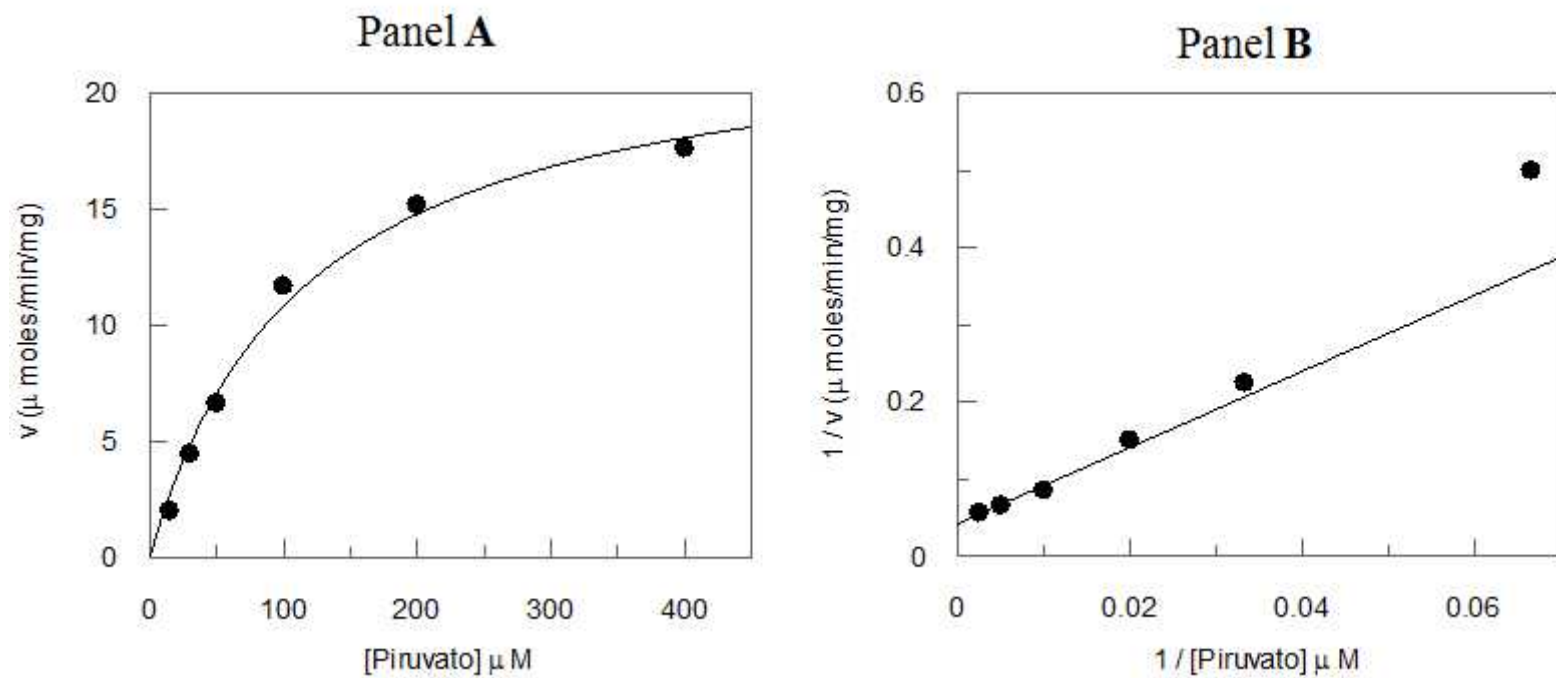


Figura 18. Cinética de reacción de la LDH2. Panel A: velocidad inicial vs concentración de piruvato; Panel B: gráfica de Lineweaver-Burk de los datos de velocidad inicial. Sustrato variable: piruvato, sustrato fijo NADH 100 $\mu\text{ M}$.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El entendimiento de los procesos celulares y mecanismos bioquímicos que ayudan a solventar las carencias energéticas durante los procesos de estrés principalmente por hipoxia en invertebrados marinos, puede ayudar a comprender cómo estas especies se han adaptado para sobrevivir ante un medio ambiente hostil. La lactato deshidrogenasa es una proteína clave del metabolismo anaeróbico, por lo tanto, su caracterización y estudio es indispensable sobre todo en crustáceos decápodos que han demostrado una especial tolerancia a situaciones de baja tensión de oxígeno.

En resumen, se lograron obtener 2 plásmidos recombinantes de las subunidades de la LDH de camarón blanco *L. vannamei* con un 100% de identidad con las secuencias previamente reportadas por Soñanez-Organis *et al* (2012). En los procesos de producción de las proteínas recombinantes para la sobreexpresión se determinó una concentración óptima del inductor IPTG de 0.2 mM con un tiempo de inducción de 2 horas totales. En cuanto a la purificación se logró una mejor solubilización de la proteína recombinante al resuspender el pellet bacteriano en un 10% del volumen original. Por ejemplo, para un pellet de 1000 ml éste deberá ser resuspendido en 100 ml de buffer de columna. También se alcanzó un mejor rendimiento en la purificación al recircular por lo menos 2 veces la fase soluble o clarificado en la matriz de quitina previo a los lavados.

Se sobreexpresaron las dos subunidades de la LDH de *L. vannamei*, sin embargo, solo se pudo purificar la subunidad de la LDH2. La proteína purificada es de un tamaño de 34 kDa y al parece en su forma activa es un tetrámero de 140 kDa, esto en base a la migración que se observó en geles nativos, en los cuales también se comprobó cualitativamente que la proteína de la LDH2 es capaz de metabolizar lactato usando NAD^+ como cofactor.

Por último en los ensayos enzimáticos por espectrofotometría se determinaron los valores aparentes de K_m (0.1147 mM) y V_{max} (22.29 $\mu\text{moles NAD}^+/\text{min}/\text{mg}$ proteína)

para piruvato. En las corridas de velocidad se tuvieron problemas al analizar los datos, ya que aparentemente en algún punto intermedio del ensayo la enzima comenzaba a producir la reacción inversa de lactato a piruvato, lo que dificultó un buen ajuste de los datos inicialmente a una hipérbola rectangular Michaeliana y posteriormente al análisis de dobles recíprocos para determinar la K_m y V_{max} reales de la enzima. Es por ello, que se propone buscar análogos no re-metabolizables de piruvato o NADH en los futuros ensayos cinéticos. En relación a los valores de K_m y V_{max} aparentes, éstos presentan una alta similitud con otros datos reportado para LDH en crustáceos e incluso con organismos vertebrados, no obstante, aún no es posible determinar con exactitud la importancia y protagonismo metabólico de la LDH en el camarón blanco. Por lo tanto, es necesario terminar los estudios cinéticos para tener datos más claros y sólidos que ayuden a entender estas proteínas. Por esto último, también es prioritario purificar la LDH1 y hacer su caracterización completa.

BIBLIOGRAGÍA

- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W. y Lipman D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215:403-410.
- Angers A., Pothier F., Sévigny J.-M. y Sainte-Marie B. 1994. Tissue specificity and ontogeny of lactate dehydrogenase in snow crab, *Chionoecetes opilio* (Brachyura, Majidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 108:385-395.
- Appella E. y Markert C.L. 1961. Dissociation of lactate dehydrogenase into subunits with guanidine hydrochloride* 1. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 6:171-176.
- Battellino L.J., Jaime F.R. y Blanco A. 1968. Kinetic Properties of Rabbit Testicular Lactate Dehydrogenase Isozyme. *Journal of Biological Chemistry* 243:5185-5192.
- Berg J.M., Stryer L. y Tymoczko J.L. 2008. *Bioquímica* Reverte Editorial Santillana.
- Betsche T. 1981. L-Lactate dehydrogenase from leaves of higher plants. Kinetics and regulation of the enzyme from lettuce (*Lactuca sativa* L). *Biochemical Journal* 195:615.
- Bishop M.J., Everse J. y Kaplan N.O. 1972. Identification of Lactate Dehydrogenase Isoenzymes by Rapid Kinetics. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 69:1761-1765.
- Borgmann U., LAidler K.J. y Moon T.W. 1975. Kinetics and Thermodynamics of Lactate Dehydrogenases from Beef Heart, Beef Muscle, and Flounder Muscle. *Canadian Journal of Biochemistry* 53:1196-1206.
- 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.
- Brooks G.A. y Gaesser G.A. 1980. End points of lactate and glucose metabolism after exhausting exercise. *Journal of Applied Physiology* 49:1057-1069.

- Brown-Peterson N.J., Manning C.S., Patel V., Denslow N.D. y Brouwer M. 2008. Effects of cyclic hypoxia on gene expression and reproduction in a Grass Shrimp, *Palaemonetes pugio*. *The Biological Bulletin* 214:6.
- Burnett L.E. y Stickle W.B. 2001. Physiological responses to hypoxia. Coastal hypoxia: consequences for living resources and ecosystems.
- Coenzima.com. 2011. Adenosina Trifosfato (ATP), http://www.coenzima.com/adenosina_trifosfato_atp.
- Cohen R.D. y Simpson R. 1975. Lactate Metabolism. *Anesthesiology* 43:661-673.
- Crawford D.L., Constantino H.R. y Powers D.A. 1989. Lactate dehydrogenase-B cDNA from the teleost *Fundulus heteroclitus*: evolutionary implications. *Molecular Biology and Evolution* 6:369-383.
- Cheng W., Liu C.-H., Hsu J.-P. y Chen J.-C. 2002. Effect of hypoxia on the immune response of giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* and its susceptibility to pathogen *Enterococcus*. *Fish & Shellfish Immunology* 13:351-365.
- David E., Tanguy A., Pichavant K. y Moraga D. 2005. Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hypoxia exposure under experimental conditions. *FEBS Journal* 272:5635-5652.
- Davies D. y Davies S. 1972. Purification and properties of L (+)-lactate dehydrogenase from potato tubers. *Biochemical Journal* 129:831.
- Diaz J.R. y Rosenberg R. 1995. Marine benthic hypoxia: a review its ecological effects and the behavioural responses of benthic macrofauna *Oceanography and Marine Biology Annual Review* 33:245-303.
- Effer W. y Ranson S. 1967. Some effects of oxygen concentration on levels of respiratory intermediates in buckwheat seedlings. *Plant physiology* 42:1053-1058.
- Eichner R.D. y Kaplan N.O. 1977. Catalytic properties of lactate dehydrogenase in *Homarus americanus*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 181:501-507.
- Fandrey J. 1995. Hypoxia-inducible gene expression. *Respiration Physiology* 101:1-10.

- Farahani R. y Haddad G.G. 2003. Understanding the molecular responses to hypoxia using *Drosophila* as a genetic model. *Respiratory Physiology & Neurobiology* 135:221-229.
- Fields J.H.A. 1983. Alternatives to lactic acid: Possible advantages. *Journal of Experimental Zoology* 228:445-457.
- Fournier P.A. y Guderley H. 1992. Metabolic fate of lactate after vigorous activity in the leopard frog, *Rana pipiens*. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 262:R245-R254.
- Gamble J.C. 1971. The Responses of the Marine Amphipods *Corophium Arenarium* and *C. Volutator* to Gradients and to Choices of Different Oxygen Concentrations. *Journal of Experimental Biology* 54:275-290.
- Gibbs M., Gfeller R.P. y Chen C. 1986. Fermentative metabolism of *Chlamydomonas reinhardtii* III. Photoassimilation of acetate. *Plant Physiology* 82:160-166.
- Gladden L.B. 2004. Lactate metabolism: a new paradigm for the third millennium. *The Journal of Physiology* 558:5-30.
- Gleason F.H., Price J.S., Mann R.A. y Stuart T.D. 1971. Lactate dehydrogenases from crustaceans and arachnids. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* 40:387-394.
- Gleeson T.T. 1991. Patterns of Metabolic Recovery from Exercise in Amphibians and Reptiles. *Journal of Experimental Biology* 160:187-207.
- Gleeson T.T. y Dalessio P.M. 1989. Lactate and Glycogen Metabolism in the Lizard *Dipsosaurus Dorsalis* following Exhaustive Exercise. *Journal of Experimental Biology* 144:377-393.
- Good A.G. y Crosby W.L. 1989. Induction of alcohol dehydrogenase and lactate dehydrogenase in hypoxically induced barley. *Plant Physiology* 90:860-866.
- Good A.G. y Muench D.G. 1993. Long-term anaerobic metabolism in root tissue (metabolic products of pyruvate metabolism). *Plant Physiology* 101:1163-1168.
- Gracey A.Y., Troll J.V. y Somero G.N. 2001. Hypoxia-induced gene expression profiling in the euryoxic fish *Gillichthys mirabilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98:1993-1998.

- Gray J.S., Wu R.S. y Or Y.Y. 2002. Effects of hypoxia and organic enrichment on the coastal marine environment. *Marine Ecology Progress Series* 238:249-279.
- Greenway S.C. y Storey K.B. 1999. The effect of prolonged anoxia on enzyme activities in oysters (*Crassostrea virginica*) at different seasons. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 242:259-272.
- Greenway S.C. y Storey K.B. 2001. Effects of seasonal change and prolonged anoxia on metabolic enzymes of *Littorina littorea*. *Canadian Journal of Zoology* 79:907-915.
- Groscolas R. y Rodriguez A. 1982. Glucose and lactate kinetics and interrelations in an antarctic bird (*Emperor penguin*). *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 242:R458-R464.
- Herreid II C.F. 1980. Hypoxia in invertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* 67:311-320.
- Hill R.W., Wyse G.A. y Anderson M. 2004. *Fisiología Animal*. Primera ed. Médica Panamericana S. A., Madrid.
- Hochachka P.W. 1993. *Surviving hypoxia: mechanisms of control and adaptation* CRC Press, Boca Raton.
- Hochachka P.W., Buck L.T., Doll C.J. y Land S.C. 1996. Unifying theory of hypoxia tolerance: molecular/metabolic defense and rescue mechanisms for surviving oxygen lack. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 93:9493-9498.
- Holbrook J.J., Liljas A., Steindel S.J. y Rossmann M.G. 1975. 4 Lactate Dehydrogenase, in: D. B. Paul (Ed.), *The Enzymes*, Academic Press. pp. 191-292.
- Holeton G.F. y Randall D.J. 1967. The Effect of Hypoxia Upon the Partial Pressure of Gases in the Blood and Water Afferent and Efferent to the Gills of Rainbow Trout. *Journal of Experimental Biology* 46:317-327.
- Johns G.C. y Somero G.N. 2004. Evolutionary convergence in adaptation of proteins to temperature: A4-lactate dehydrogenases of Pacific damselfishes (*Chromis* spp.). *Molecular Biology and Evolution* 21:314-320.

- Kühl S. y Schneppenheim R. 1986. Electrophoretic investigation of genetic variation in two krill species *Euphausia superba* and *E. crystallorophias* (Euphausiidae). *Polar Biology* 6:17-23.
- Laemmli U.K. 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Larade K. y Storey K.B. 2002a. Chapter 3 A profile of the metabolic responses to anoxia in marine invertebrates, in: K. B. Storey and J. M. Storey (Eds.), *Cell and Molecular Response to Stress*, Elsevier. pp. 27-46.
- Larade K. y Storey K.B. 2002b. Characterization of a novel gene up-regulated during anoxia exposure in the marine snail, *Littorina littorea*. *Gene* 283:145-154.
- Larade K. y Storey K.B. 2004. Anoxia-induced transcriptional upregulation of sarp-19: cloning and characterization of a novel EF-hand containing gene expressed in hepatopancreas of *Littorina littorea*. *Biochemistry and Cell Biology* 82:285-293.
- Long G.L. 1976. The stereospecific distribution and evolutionary significance of invertebrate lactate dehydrogenases. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* 55:77-83.
- Long G.L. y Kaplan N.O. 1968. D-lactate specific pyridine nucleotide lactate dehydrogenase in animals. *Science* 162:685-686.
- Lunt S.Y. y Vander Heiden M.G. 2011. Aerobic Glycolysis: Meeting the Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 27:441-464.
- Ma E., Xu T. y Haddad G.G. 1999. Gene regulation by O₂ deprivation: an anoxia-regulated novel gene in *Drosophila melanogaster*. *Molecular Brain Research* 63:217-224.
- Maekawa M. 1988. Lactate dehydrogenase isoenzymes. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 429:373-398.
- Manchenko G. 1994. *Detection of Enzymes on Electrophoretic Gels. A Handbook*. Boca Raton, FL: CRC Press. Inc 440:38.
- Markert C., Shaklee J. y Whitt G. 1975. Evolution of a gene. Multiple genes for LDH isozymes provide a model of the evolution of gene structure, function and regulation. *Science* 189:102-114.

- Markert C.L. 1963. Lactate dehydrogenase isozymes: dissociation and recombination of subunits. *Science* 140:1329.
- Markert C.L. 1970. Isozymes and cellular differentiation. *Advances in the Biosciences* 6:511-528.
- Massaro E.J. 1970. Horseshoe crab lactate dehydrogenase: tissue distribution and molecular weight. *Science (New York, N.Y.)* 167:994-996.
- Mathews C.K., Van Holde K.E. y Ahern K.G. 2002. *Bioquímica*. Tercera ed. Pearson Educación, S. A., Madrid.
- Milligan C.L. y Girard S.S. 1993. Lactate Metabolism in Rainbow Trout. *Journal of Experimental Biology* 180:175-193.
- Mulkiewicz E., Zi tara M.S., Stachowiak K. y Skorkowski E.F. 2000. Properties of lactate dehydrogenase from the isopod, *Saduria entomon*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 126:337-346.
- Mulkiewicz E., Zi tara M.S., Strömberg J.O. y Skorkowski E.F. 2001. Lactate dehydrogenase from the northern krill *Meganyctiphanes norvegica*: comparison with LDH from the Antarctic krill *Euphausia superba*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 128:233-245.
- Newell R.C. y Courtney W.A.M. 1965. Respiratory Movements in *Holothuria Forskali* Delle Chiaje. *Journal of Experimental Biology* 42:45-57.
- Pesce A., Fondy T.P., Stolzenbach F., Castillo F. y Kaplan N.O. 1967. The Comparative Enzymology of Lactic Dehydrogenases. *Journal of Biological Chemistry* 242:2151-2167.
- Plaxton W.C. 1996. The organization and regulation of plant glycolysis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47:185-214.
- Pronk J.T., Steensma H.Y. y Van Dijken J.P. 1996. Pyruvate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 12:1607-1633.
- Renaud M.L. 1986. Detecting and avoiding oxygen deficient sea water by brown shrimp, *Penaeus aztecus* (Ives), and white shrimp *Penaeus setiferus* (Linnaeus). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 98:283-292.
- Sambrook J. y Russell D.W. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

- Sanger F., Nicklen S. y Coulson A.R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 74:5463.
- Scheid M.J. y Awapara J. 1972. Stereospecificity of some invertebrate lactic dehydrogenases. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 43:619-626.
- Schuchard M., Mehigh R. y Kappel W. 2002. ProteoSilver™: High Sensitivity Silver Stain for SDS-PAGE. Sigma-Aldrich.
- Selander R.K., Yang S.Y., Lewontin R.C. y Johnson W.E. 1970. Genetic Variation in the Horseshoe Crab (*Limulus polyphemus*), A Phylogenetic "Relic". *Evolution*:402-414.
- Semenza G.L., Roth P.H., Fang H.M. y Wang G.L. 1994. Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. *Journal of Biological Chemistry* 269:23757-23763.
- Soñanez-Organis J.G., Rodriguez-Armenta M., Leal-Rubio B., Peregrino-Uriarte A.B., Gómez-Jiménez S. y Yepiz-Plascencia G. 2012. Alternative splicing generates two lactate dehydrogenase subunits differentially expressed during hypoxia via HIF-1 in the shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Biochimie* 94:1250-1260.
- Sugden M.C. y Holness M.J. 2003. Recent advances in mechanisms regulating glucose oxidation at the level of the pyruvate dehydrogenase complex by PDKs. *American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism* 284:E855-E862.
- Thompson J.D., Higgins D.G. y Gibson T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22:4673-4680.
- Tsoi S.C.M. y Li S.S.L. 1994. The Nucleotide and Deduced Amino-Acid Sequences of a cDNA Encoding Lactate Dehydrogenase from *Caenorhabditis elegans*: The Evolutionary Relationships of Lactate Dehydrogenases from Mammals, Birds, Amphibian, Fish, Nematode, Plants, Bacteria, Mycoplasma, and Plasmodium. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 205:558-564.

- Valenzuela M.A., Suárez J., Sánchez A. y Rosas C. 2002. Cultivo del camarón blanco del Golfo de México (*Litopenaeus setiferus*) en estanques de manto freático II Congreso Nacional de la Asociación Mexicana de Limnología.
- van Dijken J.P. y Scheffers W.A. 1986. Redox balances in the metabolism of sugars by yeasts. FEMS microbiology letters 32:199-224.
- Visser W., Spronsen E.A., Nanninga N., Pronk J.T., Kuenen J.G. y Dijken J.P. 1995. Effects of growth conditions on mitochondrial morphology in *Saccharomyces cerevisiae*. Antonie Van Leeuwenhoek 67:243-253.
- Voet D. y Voet J.G. 2006. Bioquímica. Tercera ed. Medica Panamerica Buenos Aires.
- Winer A.D. y Schwert G.W. 1958. Lactate Dehydrogenase. Journal of Biological Chemistry 231:1065-1083.
- Worthington C.C. 1988. Worthington enzyme manual: enzymes and related biochemicals Worthington Biochemical Corporation.
- Wu R.S.S. 2002. Hypoxia: from molecular responses to ecosystem responses. Marine Pollution Bulletin 45:35-45.
- Wu R.S.S. y Lam P.K.S. 1997. Glucose-6-phosphate dehydrogenase and lactate dehydrogenase in the green-lipped mussel (*Perna viridis*): Possible biomarkers for hypoxia in the marine environment. Water Research 31:2797-2801.