



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

LICENCIATURA EN INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

Caracterización bioquímica de polimerasas replicativas para el desarrollo de aplicaciones biotecnológicas

TESIS

Para obtener el título de

Licenciada en Ingeniería en Biotecnología

Presenta

Andrea Ramón García

Director

Dra. Silvia Armenta Jaime

Codirector

Dr. Sergio Romero Romero

Febrero 2026

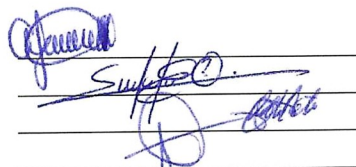
Santiago Tulantepec de Lugo Guerrero, Hidalgo., a 3 de febrero de 2026
Numero de Control: IBT-001-2026
Asunto: Autorización de impresión

Mtra. Ojuky del Rocío Islas Maldonado
Directora de Administración Escolar de la UAEH

Por este conducto y con fundamento en el Título Cuarto, Capítulo I, Artículo 40 del Reglamento de Titulación, le comunico que el jurado que le fue asignado al pasante de Licenciatura en Ingeniería en Biotecnología, **Andrea Ramón García**, quien presenta el trabajo de Tesis denominado **“Caracterización bioquímica de polimerasas replicativas para el desarrollo de aplicaciones biotecnológicas”**, que después de revisarlo en reunión de sinodales, ha decidido autorizar la impresión de este, hechas las correcciones que fueron acordadas.

A continuación, se anotan las firmas de conformidad de los miembros del jurado:

PRESIDENTE	Dra. Nayeli Shantal Castrejón Jiménez
SECRETARIO	Dr. Sergio Romero Romero
VOCAL 1	Dra. Silvia Armenta Jaime
SUPLENTE 1	Dr. Sergio Hernández León



Sin otro particular por el momento, me despido de usted.


Dr. Paul Misael Garza López
Coordinador del Ingeniería en
Biotecnología




Dr. Armando Peláez Acero
Director del Instituto de Ciencias
Agropecuarias

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES Y ACADÉMICOS

Esta tesis se realizó en el Laboratorio 225 Norte (Laboratorio de Bioquímica, Evolución & Diseño de Proteínas) del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Esta investigación fue realizada gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM, bajo el proyecto IA203925. Agradezco a la DGAPA-UNAM la beca recibida (Tipo: Licenciatura/ Titulación; con número de folio 158925). Además, este trabajo ha sido financiado por la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI), bajo el proyecto CBF2023-2024-271.

De igual manera se agradece el apoyo económico de los proyectos PAPIIT (IA203925) y SECIHTI (CBF-2023-2024-271) para la asistencia al IX Congreso de Fisicoquímica, Estructura y Diseño de Proteínas que se realizó en la ciudad de Zacatecas, México.

Agradezco la asistencia técnica y orientación metodológica del Dr. Francisco Javier de la Mora Bravo, técnico académico del Laboratorio 225 Norte donde se realizó la investigación. También agradezco la asistencia de la M. en C. Alma Jessica Díaz Salazar, del Laboratorio de Biofisicoquímica de la Facultad de Química, UNAM, para la realización de los experimentos de Calorimetría Diferencial de Barrido. Agradezco a la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular (responsable: Dra. Laura Ongay Larios) por facilitar el acceso a la instrumentación para la cuantificación de muestras y por la asistencia en la realización de experimentos de qPCR. Asimismo, agradezco a la técnico Nallely Cano Domínguez por el apoyo, así como por el uso de equipo y reactivos necesarios para la realización de qPCR. De igual manera, se agradece el uso de la infraestructura y ayuda técnica en los experimentos de cristalografía de proteínas que se realizaron en Laboratorio Nacional de Estructuras de Macromoléculas (LANEM) sede Instituto de Química, UNAM. Asimismo, algunos experimentos espectroscópicos se realizaron en el Laboratorio de Fisicoquímica e Ingeniería de Proteínas de la Facultad de Medicina, UNAM.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mi madre y a mi padre, les expreso mi más profundo agradecimiento por su apoyo incondicional y por todo lo que han hecho para que pudiera alcanzar mis sueños.

A mis amigas Angely y Ángeles, gracias por su sincera amistad, por sus consejos, apoyo y compañía. Sin duda, gracias a ustedes mi etapa universitaria fue más llevadera y significativa.

A mis mentores, la Dra. Silvia Armenta, le agradezco por introducirme al fascinante mundo de las proteínas, por fomentar el empoderamiento femenino en la ciencia y por todo el apoyo brindado durante el desarrollo de este proyecto. Al Dr. Sergio Romero, le agradezco la cálida bienvenida en su laboratorio, así como su paciencia, guía y enseñanzas a lo largo de este trabajo. A ambos mentores les agradezco profundamente las oportunidades que pude vivir bajo su tutela.

Finalmente, a mis compañeros del Laboratorio 225N, les agradezco su apoyo, su amistad y su calidez humana, por hacer de este proceso una experiencia inolvidable. En especial, a Luisito y Dieguchis, por su cálida bienvenida, su paciencia, sus consejos y, sobre todo, por su valiosa amistad. A Vincent le agradezco su infinita paciencia para explicarme, ayudarme y darme consejos sobre mi proyecto. También quisiera agradecer a mis amigos del club del agua, Zam y Luz, por brindarme un momento de calma en medio de días agitados.

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES Y ACADÉMICOS	ii
AGRADECIMIENTOS PERSONALES	iii
ÍNDICE GENERAL	iv
RESUMEN	vii
ABSTRACT	viii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	2
2.1. Alcances biotecnológicos de las ADN polimerasas	2
2.1.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	2
2.1.2. Secuenciación	3
2.1.3. Espectro expandido de sustratos	4
2.2. Limitaciones y áreas de oportunidad promisorias de ADN polimerasas termoestables	4
2.3. Polimerasas termoestables	6
2.4. Clasificación	7
2.5. Polimerasas de la familia C	9
2.5.1. Características estructurales	9
2.5.2. Importancia de la subunidad α en el mecanismo de acción	12
2.6. Técnicas para estudiar la estructura de estas proteínas	13
2.6.1. Dicroísmo circular (DC)	14
2.6.2. Fluorescencia intrínseca	14
2.6.3. Calorimetría de barrido diferencial (DSC)	15
2.6.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) como ensayo funcional	15
3. ANTECEDENTES	16
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	19
5. JUSTIFICACIÓN	20
6. HIPÓTESIS	21
7. OBJETIVOS	22
7.1. Objetivo general	22
7.2. Objetivos específicos	22
8. MATERIALES Y MÉTODOS	23
8.1. Materiales	23

8.1.1.	Reactivos	23
8.1.2.	Buffers y soluciones.....	24
8.1.3.	Medios de cultivo	26
8.1.4.	Cepas y vectores	26
8.1.5.	Kits y consumibles	27
8.1.6.	Equipos	27
8.1.7.	Software	29
8.2.	Métodos	29
8.2.1.	Transformación de células quimiocompetentes.....	30
8.2.2.	Expresión proteica	30
8.2.3.	Sobre expresión de proteína soluble.....	32
8.2.4.	Lisado celular y confirmación de expresión por SDS-PAGE	32
8.2.5.	Purificación de proteínas	34
8.2.6.	Determinación de la concentración de proteína.	35
8.2.7.	Ensayos de termoestabilidad	36
8.2.8.	Dicroísmo circular (DC) en el UV lejano.....	36
8.2.9.	Fluorescencia intrínseca (IF)	38
8.2.10.	Cristalografía de proteínas	38
8.2.11.	Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	39
8.2.12.	Ensayos de actividad catalítica	40
9.	RESULTADOS	41
9.1.	Ensayos de expresión	41
9.1.1.	Pol-III-EcMut presenta una mayor expresión soluble en la cepa Rosetta (DE3)	41
9.1.2.	Pol-III-Aa presenta una mayor expresión soluble en la cepa BL21 Star (DE3) ..	43
9.2.	Estrategias diferenciales de purificación revelan propiedades bioquímicas distintas entre ambas polimerasas.....	44
9.2.1.	Múltiples pasos cromatográficos permiten purificar la Pol-III-EcMut a homogeneidad.....	44
9.2.2.	La Pol-III-Aa sin etiqueta puede purificarse eficientemente mediante estrategias bioquímicas clásicas	46
9.3.	Ensayos de termoestabilidad	49
9.3.1.	La Pol-III-Aa mantiene estabilidad térmica y permite purificación por calor.....	49
9.3.2.	La Pol-III-EcMut presenta menos estabilidad térmica y rápida pérdida de solubilidad.....	52

9.4.	Ambas polimerasas conservan una estructura secundaria predominantemente α -helicoidal consistente con los modelos de AlphaFold	53
9.5.	Ambas polimerasas presentan espectros de fluorescencia característicos de proteínas correctamente plegadas	55
9.6.	La Pol-III-Aa presenta mayor estabilidad térmica que la variante Pol-III-EcMut.....	56
9.7.	Las Pol III muestran actividad catalítica limitada bajo las condiciones evaluadas.....	58
10.	DISCUSIÓN	61
11.	CONCLUSIONES	68
12.	PERSPECTIVAS	70
13.	REFERENCIAS	71
14.	ANEXO.....	79
14.1.	Figuras complementarias	79
14.2.	Tablas complementarias.....	80

RESUMEN

Las ADN polimerasas son enzimas esenciales para la vida, responsables de la duplicación del ADN genómico durante la replicación celular, en coordinación con otras proteínas del replisoma. En este trabajo se estudió la subunidad α de la Pol III de *Aquifex aeolicus* (Pol-III-Aa) y una variante mutante de *Escherichia coli* (Pol-III-EcMut), con el objetivo de analizar y comparar sus propiedades bioquímicas, estructurales y funcionales. Para ello, se realizaron ensayos de expresión, purificación, y termoestabilidad, así como análisis mediante espectroscopía de dicroísmo circular, fluorescencia intrínseca, calorimetría diferencia de barrido y ensayos de actividad catalítica mediante qPCR. Los resultados mostraron que la Pol-III-Aa tuvo una mejor expresión en la cepa BL21 Star (DE3), bajo condiciones de baja temperatura y tiempos prolongados de inducción, mientras que la Pol-III-EcMut mostró mayor expresión y solubilidad en la cepa Rosetta (DE3), a temperaturas ligeramente más altas, tiempos de inducción más cortos y mayores concentraciones de IPTG. Las estrategias diferenciales de purificación evidenciaron propiedades bioquímicas distintas entre ambas polimerasas. En los ensayos de termoestabilidad la Pol-III-Aa mostró una mayor resistencia al calor, lo que permitió incorporar un paso adicional de purificación mediante tratamiento térmico. Los análisis de dicroísmo circular indicaron que ambas polimerasas conservan una estructura secundaria predominantemente α -helicoidal, en concordancia con su adecuado plegamiento, el cual fue también respaldado por los resultados de fluorescencia intrínseca. Por su parte, la calorimetría diferencial de barrido mostró que ambas proteínas presentan procesos de desnaturalización en múltiples etapas, y que la Pol-III-Aa posee una mayor estabilidad térmica que la variante Pol-III-EcMut. En los ensayos de actividad catalítica, no se observaron curvas de amplificación típicas bajo las condiciones evaluadas, lo que sugiere la ausencia de actividad catalítica robusta y reproducible. Esto indica la necesidad de optimizar las condiciones experimentales o emplear metodologías alternativas para evaluar de manera concluyente la actividad enzimática. En conjunto, estos resultados aportan información clave sobre la relación entre estructura, estabilidad y función en polimerasas replicativas, sentando bases para su aprovechamiento en el desarrollo de herramientas biotecnológicas.

ABSTRACT

DNA polymerases are essential enzymes for life, responsible for the duplication of genomic DNA during cellular replication, acting in coordination with other proteins of the replisome. In this work, the α subunit of DNA polymerase III from *Aquifex aeolicus* (Pol-III-Aa) and a mutant variant from *Escherichia coli* (Pol-III-EcMut) were studied with the aim of analyzing and comparing their biochemical, structural, and functional properties. To this end, expression, purification, and thermostability assays were performed, along with analyses using circular dichroism spectroscopy, intrinsic fluorescence, differential scanning calorimetry, and catalytic activity assays by qPCR. The results showed that Pol-III-Aa exhibited better expression in the BL21 Star (DE3) strain under low-temperature conditions and prolonged induction times, whereas Pol-III-EcMut showed higher expression and solubility in the Rosetta (DE3) strain at slightly higher temperatures, shorter induction times, and higher IPTG concentrations. The different purification strategies highlighted distinct biochemical properties between both polymerases. In thermostability assays, Pol-III-Aa demonstrated greater thermal resistance, allowing the incorporation of an additional purification step based on heat treatment. Circular dichroism analysis indicated that both polymerases retain a predominantly α -helical secondary structure, consistent with a properly folded state, which was further supported by intrinsic fluorescence results. Differential scanning calorimetry revealed that both proteins undergo multi-step thermal denaturation processes, with Pol-III-Aa exhibiting higher thermal stability compared to the Pol-III-EcMut variant. In catalytic activity assays, no typical amplification curves were observed under the tested conditions, suggesting the absence of robust and reproducible enzymatic activity. This indicates the need for further optimization of experimental conditions or the use of alternative methodologies to conclusively evaluate enzymatic function. Taken together, these findings provide key insights into the relationship between structure, stability, and function in replicative polymerases, laying the groundwork for their potential application in the development of biotechnological tools.

1. INTRODUCCIÓN

La replicación del ADN es un proceso fundamental para la transferencia de información genética de los organismos y es llevada a cabo por complejos multiproteicos altamente especializados. En bacterias, este proceso es llevado a cabo por la ADN polimerasa III (Pol III), la cual constituye la principal enzima replicativa, cuya subunidad α codificada por el gen *dnaE*, es responsable de la actividad catalítica de polimerización. Debido a este papel central, el estudio de esta subunidad resulta clave para comprender los mecanismos que regulan la fidelidad y la eficiencia de la replicación.

En este trabajo se estudia la subunidad α de la Pol III de *Aquifex aeolicus* y de una variante mutante de *Escherichia coli*, con el objetivo de analizar y comparar sus propiedades bioquímicas, estructurales y funcionales. La comparación entre una enzima mesófila y una termófila permite explorar los determinantes moleculares asociados a la estabilidad térmica, el plegamiento y la actividad catalítica, aspectos fundamentales para entender la relación estructura-función de las proteínas, así como el interés en aplicaciones en el desarrollo de herramientas biotecnológicas.

Este proyecto surge a partir de estudios previos enfocados en la generación de mutaciones en la subunidad α de la ADN polimerasa III con el fin de mejorar su termoestabilidad. A partir de estos antecedentes, se planteó la necesidad de caracterizar de manera más integral la variante mutante obtenida y compararla con una polimerasa nativa de *A. aeolicus*. Esta comparación permitiría comprender mejor el comportamiento estructural y funcional de ambas proteínas, así como identificar posibles relaciones entre su estabilidad, plegamiento y actividad catalítica.

En este contexto, el presente trabajo se centra en establecer un protocolo confiable para la expresión, purificación y caracterización de ambas polimerasas. Para ello, se emplearon diversas técnicas biofísicas y moleculares, entre las que se incluyen dicroísmo circular, fluorescencia intrínseca, calorimetría diferencial de barrido y PCR en tiempo real. Estas herramientas permitieron evaluar aspectos clave como el plegamiento proteico, el estado conformacional, la estabilidad térmica y la actividad catalítica de las enzimas.

En conjunto, este estudio busca contribuir a la comprensión de los factores que determinan la estabilidad y función de polimerasas replicativas bacterianas, así como a sentar las bases para futuros estudios orientados al desarrollo de herramientas biotecnológicas basadas en enzimas con propiedades mejoradas.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Alcances biotecnológicos de las ADN polimerasas

Las ADN polimerasas son enzimas esenciales para la vida, cuya función principal es catalizar la síntesis de ADN a partir de una hebra molde, incorporando desoxinucleótidos (dNTPs) complementarios en dirección $5' \rightarrow 3'$ (Albà, 2001). Estas enzimas participan principalmente en procesos como la replicación del genoma y también en procesos como reparación del ADN, recombinación y síntesis de ADN en distintos contextos celulares (Kuznetsova et al., 2022). Estas proteínas son las responsables de duplicar el ADN genómico durante la replicación celular, trabajando en conjunto con otras proteínas del replisoma (Raia et al., 2019). Las polimerasas replicativas se caracterizan por tener alta fidelidad (bajo error de incorporación), alta procesividad (capacidad de sintetizar largas hebras sin disociarse) y, en muchos casos, actividad “proofreading” (exonucleasa $3' \rightarrow 5'$) para corregir errores (Betancurt-Anzola et al., 2025).

Debido a sus propiedades catalíticas, alta fidelidad y procesividad las ADN polimerasas son enzimas que se utilizan ampliamente como herramientas fundamentales en biología molecular y biotecnología, como lo son la PCR, secuenciación de ADN y el genotipado, entre otras aplicaciones.

2.1.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Una de las principales aplicaciones de las ADN polimerasas es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), una técnica fundamental que revolucionó el campo de la biotecnología. Debido a esto, desde sus inicios y hasta la fecha se han buscado nuevas formas de optimizar y adaptar esta técnica y sus reactivos asociados, a las necesidades emergentes en los distintos campos de investigación, dando como resultado una amplia

gama de tipos de PCR como la PCR de alta fidelidad, PCR anidada, PCR cuantitativa, PCR de transcripción reversa, entre otras.

Así, esta metodología ha sido ampliamente optimizada mediante el uso de polimerasas termoestables, capaces de soportar ciclos repetidos de altas temperaturas sin perder actividad. Dichas enzimas suelen pertenecer a las polimerasas de la familia A provenientes de bacterias termófilas como la Taq pol obtenida de *Thermus aquaticus*, la polimerasa T7 proveniente del bacteriófago T7 y la polimerasa Bst de *Bacillus stearothermophilus*, así como las de la familia B provenientes de arqueas hipertermófilas como la polimerasa 9°N de *Thermococcus* sp. y la Dpo4 de *Sulfolobus solfataricus* (Aschenbrenner & Marx, 2017).

Además, la ingeniería de polimerasas he permitido crear quimeras y variantes que permiten tener propiedades mejoradas como polimerasas resistentes a inhibidores (Baar et al., 2011), también se han obtenido polimerasas que son capaces de amplificar a partir de ADN dañado (Gloeckner et al., 2007) y polimerasas con mejores rangos de extensión y afinidad para PCR más rápidas (Arezi et al., 2014). Estas modificaciones han ampliado su uso en diversos campos, incluyendo diagnóstico, biología evolutiva, bioquímica y biología sintética.

2.1.2. Secuenciación

En el campo de tecnologías de secuenciación, hace algunas décadas, el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli* fue utilizado inicialmente para la determinación de ADN mediante medios enzimáticos. Posteriormente surgieron nuevas polimerasas con propiedades mejoradas, como la variante de polimerasa T7 del bacteriófago T7 con deficiencia de actividad exonucleasa, lo que permitió optimizar las reacciones de secuenciación tipo Sanger.

De manera paralela se desarrollaron otras polimerasas con características ventajosas, como mutantes de la polimerasa Taq, destacadas por su termoestabilidad y su baja discriminación de dNTPs. Asimismo, se han empleado diversas polimerasas termoestables como Pfu, Vent, Deep Vent y 9° N pol, siendo esta última utilizada en

tecnologías de secuenciación de nueva generación (NGS) debido a su capacidad de aceptar nucleótidos modificados como sustratos.

En tecnologías de secuenciación de tercera generación como la SMRT se emplean variantes de la ADN polimerasa $\phi 29$, las cuales permiten la síntesis continua de ADN con alta fidelidad (Aschenbrenner & Marx, 2017). En conjunto, estas adaptaciones han permitido ampliar el uso de las ADN polimerasas en plataformas de secuenciación cada vez más sofisticadas, destacando la importancia de sus propiedades estructurales y funcionales en el desarrollo tecnológico.

2.1.3. Espectro expandido de sustratos

Otra aplicación relevante de las ADN polimerasas es su capacidad de incorporar nucleósidos trifosfato con nucleobases modificadas, lo que permite la síntesis de oligonucleótidos con distintas funcionalidades, como etiquetas fluorescentes o químicas.

Para la incorporación de pares de bases no naturales, se han identificado y caracterizado polimerasas con esta capacidad. Por ejemplo, la polimerasa TerminatorTM es capaz de sintetizar ácidos nucleicos alternativos como glicol nucleico y ácido nucleico treósico, a partir de templados de ADN. Asimismo, variantes de la polimerasa Tgo han demostrado ser capaces de sintetizar ácidos nucleicos con modificaciones en el esqueleto fosfodiéster.

Estas cualidades han sido ampliamente aprovechadas en investigaciones de biología sintética y tecnologías emergentes donde la expansión del alfabeto genético y la modificación química del ADN representan herramientas clave (Aschenbrenner & Marx, 2017). En este contexto, la plasticidad estructural de las ADN polimerasas resulta fundamental para su adaptación a nuevos sustratos.

2.2. Limitaciones y áreas de oportunidad promisorias de ADN polimerasas termoestables

A pesar de su amplia utilidad en la biotecnología, las polimerasas termoestables presentan diversas limitaciones técnicas que influyen en su desempeño. Muchas polimerasas muestran sesgos de amplificación, particularmente en regiones ricas en GC

o estructuras secundarias complejas, lo que se traduce en un rendimiento reducido o en la introducción de errores en secuencias repetitivas de difícil amplificación. Estas limitaciones pueden generar pérdidas de representación en librerías o fallos en determinadas reacciones (Neffati et al., 2021).

Otro reto importante es la relación entre fidelidad, velocidad y tolerancia, ya que la optimización de una de estas propiedades puede afectar negativamente a las otras. Esto lleva a la necesidad de seleccionar o diseñar polimerasas dependiendo de la aplicación que se le quiera dar (Wang et al., 2022).

En términos de costos y accesibilidad las polimerasas recombinantes de alto desempeño como las versiones comerciales de alta fidelidad o “hotstart”, suelen ser más costosas, lo que limita su uso en contextos donde los recursos son limitados (Ishino & Ishino, 2014).

Asimismo, aunque se han desarrollado variantes capaces de incorporar nucleótidos no canónicos, la eficiencia y fidelidad en el uso de sustratos alternativos siguen siendo áreas activas de investigación y desarrollo (Laos et al., 2014).

Estas limitaciones abren nuevas oportunidades para investigación y mejora. Una de estas es la ingeniería dirigida y la evolución *in vitro*, en la cual, mediante mutagénesis dirigida, es posible generar polimerasas con combinaciones de estabilidad, fidelidad y tolerancia deseadas. Estas estrategias han producido variantes útiles para RT PCR todo en uno y para síntesis de nucleótidos no naturales (Coulther et al., 2019). Otra área de oportunidad son las aplicaciones diagnósticas de campo y “point of care” para el desarrollo de polimerasas más robustas frente a inhibidores y más estables a almacenamiento a temperatura ambiente, facilitando ensayos portátiles en entornos con recursos e infraestructura limitados. Asimismo, la síntesis de ácidos nucleicos no naturales y el uso de polimerasas adaptadas a XNAs (ácidos xenonucleicos) representan áreas emergentes de investigación que abren nuevas posibilidades en biotecnología, almacenamiento de datos en ADN y terapias génicas (Laos et al., 2014). En este contexto, el estudio de nuevas polimerasas y variantes, así como la comprensión de los determinantes moleculares que gobiernan su estabilidad y actividad, resulta fundamental para ampliar su potencial biotecnológico.

2.3. Polimerasas termoestables

Las ADN polimerasas termoestables son herramientas centrales en la biotecnología moderna ya que permiten la amplificación y manipulación de ácidos nucleicos a temperaturas elevadas. Desde la introducción de la polimerasa Taq en los años 1980, el uso de polimerasas resistentes al calor revolucionó técnicas como la PCR, la secuenciación, el clonaje molecular, la preparación de librerías para secuenciación de nueva generación y múltiples plataformas diagnósticas como PCR en tiempo real y RT-PCR.

Además, las polimerasas termoestables y sus variantes han encontrado aplicaciones en el ensamblaje de genes, la síntesis de ADN modificado y en metodologías de biología sintética que requieren condiciones más exigentes (Ishino & Ishino, 2014).

La termoestabilidad se define como la capacidad de una enzima de mantener su estructura y actividad catalítica tras la exposición a altas temperaturas. Esta propiedad es imprescindible para amplificar fragmentos largos de ADN y para el desarrollo de protocolos rápidos y robustos de PCR (Terpe, 2013). En este sentido, el estudio de polimerasas provenientes de organismos termófilos, así como su comparación con enzimas mesófilas, permite identificar los determinantes moleculares que favorecen la estabilidad térmica sin comprometer la actividad catalítica. Este conocimiento es particularmente relevante para el diseño y optimización de enzimas con aplicaciones biotecnológicas, y proporciona un marco conceptual importante para el análisis de polimerasas replicativas como la ADN polimerasa III.

En el mercado actual de polimerasas termoestables comerciales utilizadas en la biotecnología se tienen las siguientes:

Tabla 1. Polimerasas termoestables comerciales usadas actualmente en el mercado (info a marzo 2026).

Polimerasa	Organismo	Familia	Características	Casa comercial
			Temperatura optima (° C)	Actividad exonucleasa
<i>Pfu pol</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>	B	75	3' - 5'
				Stratagene, Agilent Technologies, Promega
<i>Taq pol</i>	<i>Thermus aquaticus</i>	A	72	5' - 3'
				Cetus, Hoffmann-La Roche
<i>Tth pol</i>	<i>Thermus thermophilus</i>	A	75	5' - 3'
				Perkin-Elmer Cetus, Roche
Vent pol/ Deep Vent	<i>Thermococcus litoralis</i>	B	72	3' - 5'
				New England Biolabs (NEB)
KOD pol	<i>Thermococcus kodakaraensis</i>	B	72	3' - 5'
				Novagen

(Akram et al., 2023)

2.4. Clasificación

Las ADN polimerasas se clasifican con base en análisis filogenéticos y en la similitud de sus secuencias y dominios estructurales. Actualmente se reconocen siete familias principales: A, B, C, D, X, Y y RT. Cada familia agrupa enzimas con características estructurales y funcionales similares, pero con roles biológicos diferentes. La siguiente tabla presenta un resumen de las familias más relevantes y sus características principales (Tabla 2). En conjunto estas familias abarcan polimerasas con diversas

funciones, incluyendo replicación, reparación, translesión y retrotranscripción ((Kuznetsova et al., 2022).

Tabla 2. Clasificación y características principales de las ADN polimerasas replicativas.

Familia	Taxón	Funciones típicas	Características	Ejemplos de polimerasas
A	Bacterias Virus Eucariotas	Reparación, procesamiento de fragmentos de Okazaki, replicación en algunos virus	Sitio catalítico tipo "Klenow-like", muchas tienen actividad exonucleasa (Kuznetsova et al., 2022)	Pol Y, Pol I, Pol T7
	Eucariotas Arqueas Virus Bacterias	Principal polimerasa replicativa en eucariotas, replicación en arqueas y algunos virus	Alta fidelidad, alta procesividad, subunidades múltiples	Pol II, Pol T4, Pol α , Pol δ , Pol ζ , Pol ϵ
C	Bacterias	Replicación del cromosoma bacteriano	Núcleo heteromérico: subunidad polimerasa + subunidad proof-reading (exonucleasa 3'→5') + subunidades accesorias (Albà, 2001)	Pol III
D	Arqueas	Replicación de genoma en arqueas	Conformación estructural distinta, heterodímero (subunidad de polimerasa + subunidad exonucleasa) (Raia et al., 2019)	Pol D

			Proteínas relativamente pequeñas, sin alta procesividad, con funciones de reparación específicas (Kuznetsova et al., 2022)	Pol β , Pol σ , Pol λ , Pol μ , TdT, Pol χ , Pol ASFV
X	Eucariotas Bacterias Virus Arqueas	Reparación de ADN (reconstrucción, reparación de bases)		
Y	Bacterias Eucariotas Arqueas	Síntesis translesional (TLS)	Menor precisión, su subdominio de dedos es reducido para permitir pasar lesiones (Kuznetsova et al., 2022)	Rev1, Pol ι , Pol κ , Pol η , Pol IV, Pol V, Pol Dpo4
RT	Retrovirus Eucariotas	Retrotranscripción, síntesis de ADN viral, mantenimiento de telómeros	Usan ARN como molde (Kuznetsova et al., 2022)	Telomerasas Transcriptasa reversa

2.5. Polimerasas de la familia C

Las polimerasas de la familia C, como la Pol III de *Escherichia coli* son las principales responsables de la replicación del ADN cromosómico. Su complejidad estructural y funcional la convierten en una máquina de replicación altamente eficiente, con múltiples subunidades que trabajan de forma coordinada para garantizar la síntesis rápida, precisa y procesiva de las dos hebras de ADN durante la duplicación celular (Kelman & O'Donnell, 1995). Por lo tanto, la familia C resulta de particular interés, ya que incluye a las polimerasas replicativas bacterianas, como la ADN polimerasa III, que presentan alta eficiencia y complejidad estructural.

2.5.1. Características estructurales

La ADN polimerasa está conformada por un centro catalítico y varios subcomplejos auxiliares que le otorgan sus propiedades de alta fidelidad, alta procesividad y

coordinación de la replicación en ambas hebras (S. Maki & Kornberg, 1988). En bacterias gram negativas la polimerasa replicativa es la subunidad α y se le denomina Pol III, mientras en las bacterias gram positivas se llama Pol C (Kuznetsova et al., 2022). Ambas polimerasas cuentan con un dominio de dedos más largo que cualquier otra polimerasa. De forma general, las subunidades del centro catalítico son (Kuznetsova et al., 2022; Parasuram et al., 2018):

- Subunidad α : es la polimerasa propiamente dicha, responsable de la síntesis de la nueva hebra de ADN. En *E. coli*, es producto del gen *dnaE*.
- Subunidad ϵ : esta subunidad tiene actividad exonucleasa 3'→5', por lo que es la responsable de la función de corrección de errores durante la síntesis para asegurar fidelidad.
- Subunidad θ : esta subunidad se asocia con la subunidad ϵ , y aunque su función precisa es menos crítica, se cree que estabiliza la acción de ϵ o modula su actividad.

Para que el centro catalítico logre una replicación eficiente y tenga actividad procesiva este necesita de varias subunidades auxiliares:

- Subunidad β : forma un dímero (β_2) que actúa como abrazadera deslizante, esta abrazadera encierra la doble hélice de ADN y mantiene unida la polimerasa al molde (Kelman & O'Donnell, 1995).
- Complejo cargador de abrazadera: este complejo es el encargado de colocar la abrazadera β_2 sobre el ADN cebado de forma dependiente de ATP. En *E. coli*, está formado por varias subunidades codificadas por el gen *dnaX* entre ellas τ y γ y por otras subunidades δ , δ' , χ , ψ (Dohrmann et al., 2016).
- Subunidad τ / γ : dimeriza dos centros catalíticos, de modo que la holoenzima pueda replicar simultáneamente ambas hebras de la horquilla de replicación: la hebra conductora y la hebra rezagada (Kelman & O'Donnell, 1995).

De esta forma, la holoenzima completa está compuesta por múltiples subunidades organizadas en distintos complejos, con un total de 9 a 10 subunidades diferentes: el centro catalítico (α , ϵ , θ), el dímero β , y varias subunidades del complejo cargador de

abrazadera (τ o γ , δ , δ' , χ , ψ). Mientras la subunidad α contiene 6 dominios con distintas funciones. El dominio de palma es el que contiene el sitio catalítico, el de los dedos posiciona el dNTP entrante y se encarga de la selección correcta de nucleótidos, el dominio de pulgar mantiene unido el ADN otorgándole estabilidad al complejo (Kuznetsova et al., 2022).

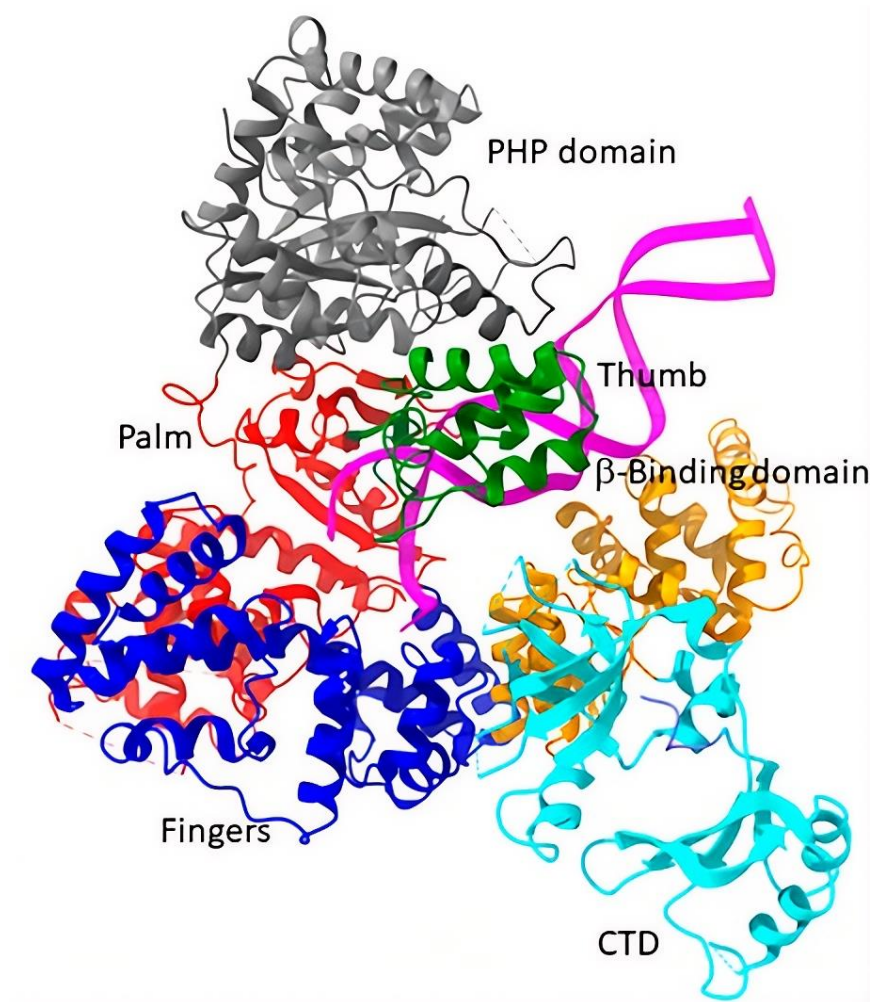


Figura 1. Estructura cristalográfica de la subunidad α de PolIII de *E. coli* con ADN (PDB ID 3e0d). En gris se muestra el dominio N- terminal junto con el dominio histidinol fosfatasa (PHP), de color rojo el dominio de la palma (Palm), de color azul el dominio de los dedos (Fingers) que interactúa con los nucleótidos entrantes, en verde se muestra el dominio del pulgar (Thumb) que se encarga de sujetar al ADN naciente,

el dominio de unión a la abrazadera deslizante β (Binding domain) se marca en naranja y el dominio C-terminal (CTD) en color cian. Tomado de (Kuznetsova et al., 2022).

2.5.2. Importancia de la subunidad α en el mecanismo de acción

La subunidad α de la Pol III es la polimerasa catalítica responsable de la síntesis de la nueva hebra de ADN durante la replicación siendo el componente esencial para la actividad de polimerización de la holoenzima. En estudios *in vitro*, la subunidad α por sí sola puede realizar sintetizar ADN en ciertos contextos, por ejemplo, llenado de huecos sobre ADN cebado (H. Maki et al., 1985). En el contexto de la holoenzima, esta subunidad junto con otras subunidades participa como centro catalítico y es responsable de la síntesis continua y coordinada de las hebras durante la replicación (Zhao et al., 2006). La eficiencia y la velocidad de replicación dependen críticamente de la subunidad α : en ensayos de replicación *in vitro*, la presencia de α es suficiente para generar síntesis procesiva cuando está asociada al resto de la holoenzima (Marians et al., 1998). Por lo anterior, se sabe que la subunidad α es el corazón catalítico de la polimerasa, es decir, la que realmente incorpora nucleótidos y extiende la cadena de ADN representando un blanco clave para estudios de caracterización estructural y funcional.

El funcionamiento coordinado de estas subunidades permite que la holoenzima lleve a cabo la replicación del ADN de forma eficiente. Primero, el cargador de abrazadera reconoce un molde cebado y utiliza ATP para cargar la abrazadera β_2 alrededor del ADN. Una vez colocada la abrazadera, el centro catalítico se asocia a ella. Esto genera una polimerasa altamente procesiva que puede sintetizar largas regiones de ADN sin disociarse. La presencia de dos centros catalíticos (gracias a τ) permite la síntesis simultánea de ambas hebras: la hebra líder y la hebra rezagada, mediante fragmentos de Okazaki. Finalmente, la subunidad ϵ actúa corrigiendo errores mediante su actividad exonucleasa 3'→5', lo que garantiza una alta fidelidad en la copia (Figura 2) (Kelman & O'Donnell, 1995; S. Maki & Kornberg, 1988).

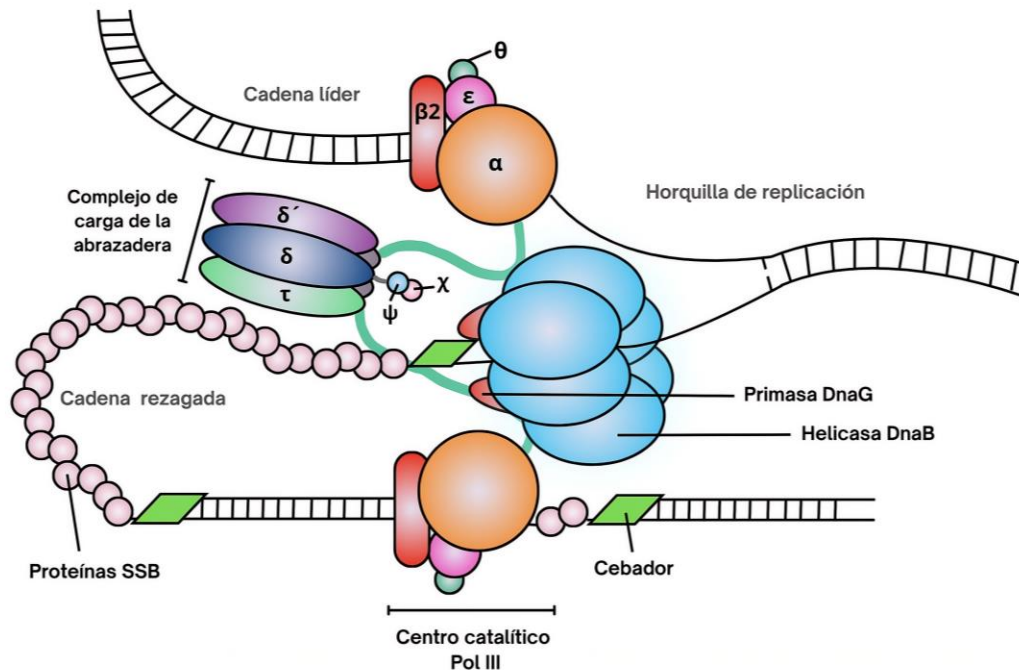


Figura 2. Replisoma de *E. coli* en la horquilla de replicación. La helicasa DnaB se localiza en el extremo de la horquilla de replicación en la cadena rezagada, donde desenrolla el ADN de doble cadena. Las proteínas SSB protegen la plantilla de la cadena rezagada que sale de la helicasa. La holoenzima de la ADN polimerasa III utiliza las hebras simples de ADN producidas por DnaB como moldes para sintetizar nuevo ADN tanto en la cadena líder como en la cadena rezagada. La abrazadera deslizante β2 confiere alta procesividad a la ADN Pol III pues mantiene los centros catalíticos unidos al ADN. El complejo cargador de abrazadera ensambla la abrazadera β2 en las uniones de los cebadores de ARN sobre el ADN molde. Hasta tres núcleos de Pol III se acoplan a través de las subunidades τ del complejo de carga mediante sus dominios C-terminales extremos, al mismo tiempo las subunidades τ también interactúan acoplando y organizando la holoenzima Pol III con la helicasa. La cadena rezagada se sintetiza en una serie de fragmentos cortos de Okazaki en dirección opuesta a la cadena líder. Las primasas DnaG interactúan con la helicasa para sintetizar cebadores de ARN, los cuales inician la síntesis de ADN en la cadena rezagada, formando así los fragmentos de Okazaki, posteriormente la Pol I se encarga de remplazar los cebadores de ARN por ADN y finalmente la ADN ligasa une estos fragmentos. Figura adaptada de (J.S et al., 2016).

2.6. Técnicas para estudiar la estructura de estas proteínas

Para el estudio de proteínas es clave fundamental caracterizar su estructura, estabilidad y funcionalidad. Con frecuencia, se emplea una combinación de técnicas espectroscópicas, térmicas y funcionales con el fin de obtener un panorama integral que abarque la estructura secundaria y terciaria, la estabilidad térmica, el plegamiento, la posible formación de agregados y la actividad enzimática. Este enfoque permite confirmar que la proteína se encuentra correctamente plegada y que conserva sus propiedades funcionales, así como evaluar el efecto de mutaciones, cambios de amortiguadores o diversas condiciones experimentales (Bolje & Gobec, 2021).

2.6.1. Dicroísmo circular (DC)

El dicroísmo circular mide la diferencia en la absorción de luz polarizada circularmente hacia la derecha e izquierda por moléculas quirales, como las proteínas. Esta diferencia se expresa como elipticidad en función de la longitud de onda. En el rango de UV lejano (180 a 250 nm), el DC proporciona información sobre la estructura secundaria de la proteína, permitiendo estimar el contenido de hélices α , láminas β o estructuras desordenadas y giros, ya que los enlaces peptídicos absorben en esa región (Rodger et al., 2005). En rangos de UV cercano (250 a 320 nm) pueden observarse señales derivadas de aminoácidos aromáticos o puentes disulfuro, lo que puede dar información sobre la estructura terciaria o entorno local de estos residuos (Rodger et al., 2005).

El DC es una técnica ampliamente utilizada para verificar el correcto plegamiento de proteínas tras procesos de purificación, cambios de buffer, mutaciones o variaciones de pH y temperatura. Asimismo, permite monitorear la desnaturalización térmica, por ejemplo, evaluando cambios en la elipticidad a 220 nm en función de la temperatura. Se trata de una técnica rápida que no requiere marcaje químico ni grandes cantidades de muestra, lo que la hace adecuada como una primera aproximación al análisis estructural. Sin embargo, el DC proporciona información global de la estructura secundaria y no ofrece detalles atómicos ni información precisa sobre estructura terciaria o cuaternaria (Bolje & Gobec, 2021).

2.6.2. Fluorescencia intrínseca

Muchas proteínas contienen residuos aromáticos como triptófano y tirosina cuya fluorescencia intrínseca depende fuertemente del entorno químico. En ambientes hidrofóbicos, típicos del interior de la proteína, las propiedades de fluorescencia difieren significativamente respecto a un entorno polar, como el solvente especialmente durante procesos de desnaturalización (Ghisaidoobe & Chung, 2014). Mediante el análisis de la intensidad de fluorescencia o del desplazamiento del máximo de emisión ($\lambda_{\max}$) bajo distintas condiciones (temperatura, pH o presencia de ligandos), es posible inferir cambios en la estructura terciaria, exposición del núcleo hidrofóbico, desplegamiento parcial o total, así como alteraciones en el entorno local de residuos clave.

Esta técnica es particularmente sensible a cambios conformacionales y complementa la información obtenida por DC, especialmente en el estudio de la estructura terciaria y procesos de desnaturalización parcial.

2.6.3. Calorimetría de barrido diferencial (DSC)

La DSC es una técnica de microcalorimetría que permite medir la capacidad calorífica (C_p) de una proteína en solución en función de la temperatura, comparándola con una referencia. Durante la desnaturalización térmica, se observa un incremento en C_p que se manifiesta como pico en la curva calorimétrica o endoterma.

A partir de estos datos, es posible obtener parámetros termodinámicos relevantes como la temperatura media de fusión (T_m), en la que el 50% de la población proteica se encuentra desplegada, la entalpía de desnaturalización (ΔH), relacionada con el número de interacciones estabilizantes que se rompen durante el proceso de desplegamiento y el cambio en capacidad calorífica (ΔC_p) relacionado con el cambio de área polar expuesta al solvente. Todo esto proporciona una huella termodinámica de la estabilidad de la proteína.

La DSC es considerada una de las técnicas más confiables para evaluar estabilidad global de proteínas, ya que no requiere ni sondas, ni etiquetas o colorantes y mide directamente la energía asociada a los cambios conformacionales relacionados con la desnaturalización. Además, esta técnica es especialmente útil para comparar variantes proteicas, protocolos experimentales, condiciones de almacenamiento, efectos de mutaciones, asociación a ligandos, entre otros (Durowoju et al., 2017; Kuril, 2024).

2.6.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) como ensayo funcional

La PCR constituye un ensayo funcional para evaluar la actividad catalítica de las ADN polimerasas, permitiendo analizar su capacidad de sintetizar ADN a partir de un molde y cebadores. Además, proporciona información sobre la eficiencia de extensión, la fidelidad, el rendimiento y el comportamiento de la enzima bajo distintas condiciones como temperatura, pH y concentración de cofactores.

Además, existen diversas variantes y modificaciones de esta técnica que permiten una caracterización más detallada de la actividad enzimática. Por ejemplo, la PCR en tiempo real (qPCR) (Heid et al., 1996) en la cual mediante el uso de fluoróforos es posible monitorear en tiempo real la acumulación del producto amplificado, proporcionando así información cuantitativa sobre la eficiencia catalítica de la polimerasa usada.

Aunque la subunidad α de la Pol III ha sido purificada y su actividad polimerasa ha sido demostrada, existen pocos estudios que aborden de manera integral su estabilidad térmica, su estructura secundaria y su comportamiento bajo condiciones biofísicas controladas.

Por ello, la caracterización conjunta de su plegamiento, estabilidad térmica y actividad catalítica resulta esencial para comprender sus propiedades funcionales y limitaciones, así como para evaluar su potencial en trabajos de ingeniería de proteínas y aplicaciones biotecnológicas.

En conjunto, estas herramientas permiten analizar de manera integral la relación entre estructura, estabilidad y actividad catalítica de las proteínas, proporcionando una base sólida para el estudio de la subunidad α de la ADN polimerasa III en este trabajo.

3. ANTECEDENTES

A partir del descubrimiento de la estructura de doble hélice del ADN, se iniciaron estudios orientados a comprender el funcionamiento de la maquinaria de replicación de esta molécula. *E. coli* es un bacilo gram-negativo, anaerobio facultativo de la familia Enterobacteriaceae. Como muchas bacterias mesófilas, su temperatura óptima de crecimiento ronda los 37 °C, con un rango de desarrollo típico de alrededor de 35-43 °C. Tiene una tasa de crecimiento relativamente rápida bajo condiciones óptimas y tiene un metabolismo heterótrofo. Debido a su facilidad de cultivo, su robustez en condiciones de laboratorio y disponibilidad de técnicas moleculares, *E. coli* es utilizado como un organismo modelo clásico en diversos campos científicos. El estudio de la ADN Pol III proveniente de *E. coli* comenzó durante la década de 1970, cuando Gefter y

colaboradores (Gefter et al., 1971) demostraron que esta enzima es la principal responsable de la síntesis del ADN en este organismo y que su gen estructural se localiza en el locus *dnaE*. Posteriormente McHenry describió que la Pol III funciona como una holoenzima, es decir, un complejo multiproteico compuesto por distintas subunidades que actúan de manera (McHenry & Crow, 1979).

A inicios de la década de 1990, Michael O'Donnell caracterizó el funcionamiento de la subunidad β y el complejo γ/τ , lo que permitió comprender con mayor profundidad la dinámica del replisoma de *E. coli*. Estos estudios establecieron que la subunidad α posee la actividad catalítica de polimerización, mientras las demás subunidades cumplen funciones estructurales, regulatorias y de procesividad (Kelman & O'Donnell, 1995).

El reconocimiento de la importancia funcional de la subunidad α impulsó los estudios estructurales detallados de esta proteína. En 2006, Lamers y colaboradores resolvieron la estructura cristalográfica de un fragmento de esta subunidad (residuos 1-917) con una resolución de 2.3 Å. Este estudio reveló que la estructura de la Pol III es notablemente diferente a la de los miembros de las familias canónicas de polimerasas de ADN, incluidas las polimerasas replicativas eucariotas. Estos hallazgos sugirieron que el origen evolutivo del replisoma bacteriano habría sido distinto (Lamers et al., 2006).

A. aeolicus es una bacteria hipertermófila, que crece en ambientes de muy alta temperatura. Su temperatura óptima de crecimiento ronda los 85 °C y tiene la capacidad de vivir hasta los 95 °C. Es un organismo quimolitótrofo, Su genoma ya ha sido completamente secuenciado, su tamaño de 1.55 Mbp comparado con el de *E. coli* implica que tiene una maquinaria metabólica más compacta y simplificada (Deckert et al., 1998). Además, posee enzimas y moléculas especialmente adaptadas para funcionar a altas temperaturas, lo que lo hace un organismo especialmente interesante para estudios estructurales, biotecnológicos (enzimas termoestables) y evolutivos. Su fisiología y metabolismo suelen reflejar características de organismos muy antiguos, lo que lo convierte en un modelo valioso para estudiar la evolución temprana de la vida, la especialización metanabólica, la estabilidad de proteínas y la adaptación a condiciones extremas (Eveleigh et al., 2013).

En el caso de la Pol III de *Aquifex aeolicus*, uno de los primeros análisis del sistema replicativo fue el realizado por Ilya Bruck y colaboradores en 2002. En este estudio se identificaron las 4 subunidades principales del complejo, incluyendo α , τ , δ , δ' , y se analizaron sus diferencias y similitudes con el replisoma de *E. coli* (Bruck et al., 2002). Aunque se reportó una mayor termolabilidad de la subunidad α en comparación con las demás subunidades del complejo, se demostró que esta proteína es capaz de mantener actividad a temperaturas elevadas de entre 50°C y 80°C, lo que sugiere un potencial interés biotecnológico (Bruck et al., 2002).

A pesar de estos avances, la información estructural experimental disponible para estas proteínas es limitada. En años recientes, herramientas de predicción estructural basadas en inteligencia artificial, como AlphaFold (Jumper et al., 2021), han permitido generar modelos tridimensionales de alta precisión para proteínas cuya estructura no ha sido resuelta experimentalmente. Estos modelos proporcionan una base útil para el análisis comparativo de la estructura secundaria y terciaria, así como para explorar posibles determinantes estructurales asociados a la estabilidad y función de las proteínas.

En este contexto, se generaron modelos estructurales predichos para la subunidad α de la ADN polimerasa III de *E. coli* y *A. aeolicus* utilizando AlphaFold (Figura 3), los cuales permiten realizar un análisis comparativo inicial de sus características estructurales y sirven como referencia para la interpretación de los resultados experimentales obtenidos en este trabajo. Sin embargo, es necesario validar y contrastar estas predicciones mediante caracterización bioquímica y biofísica, lo que permite evaluar la correspondencia entre los modelos estructurales y el comportamiento real de las proteínas.

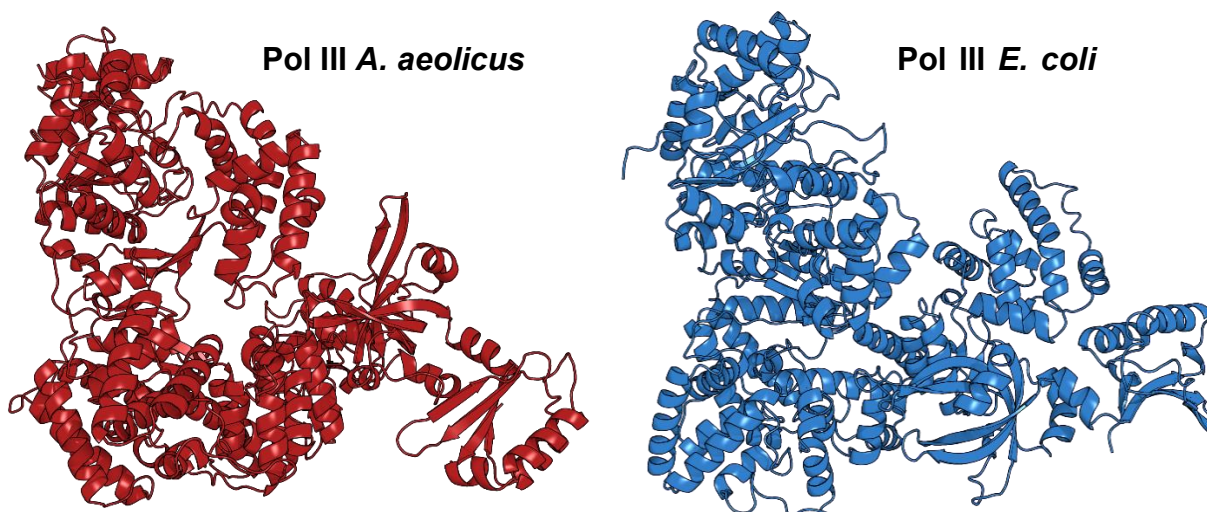


Figura 3. Modelos estructurales de la subunidad α de la Pol III generados con AlphaFold3. En rojo se muestra la Pol III de *A. aeolicus* y en azul la de *E. coli*.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La replicación del ADN es un proceso celular esencial mediado por complejos multiproteicos altamente especializados. En bacterias, la ADN polimerasa III es la principal enzima replicativa y cuya subunidad α , codificada por el gen *dnaE* es la responsable de la síntesis del ADN y de la fidelidad del proceso.

Las polimerasas replicativas bacterianas presentan diferencias significativas entre organismos mesófilos, como *Escherichia coli* y termófilos, como *Aquifex aeolicus* cuyas enzimas están adaptadas a condiciones extremas de temperatura. Estas diferencias representan una oportunidad para el desarrollo de herramientas biotecnológicas principalmente en aplicaciones que requieren polimerasas termorresistentes, con alta fidelidad y estabilidad estructural.

Sin embargo, para poder evaluar estas propiedades, y su uso en ensayos *in vitro* e industriales, es necesario disponer de las proteínas en forma soluble y catalíticamente funcionales. Ante esto la producción heteróloga de estas proteínas en *E. coli* enfrenta limitaciones como baja solubilidad, agregación y formación de cuerpos de inclusión, lo que dificulta obtener enzimas activas y bien plegadas. Esto ha limitado la caracterización

biofísica y funcional detallada de estas enzimas y, con ello, la comprensión de la relación entre estructura, estabilidad térmica y actividad catalítica.

Actualmente no se dispone de un protocolo estandarizado y validado para la sobreexpresión, purificación y caracterización estructural y funcional comparativa de la subunidad α de la ADN polimerasa III de organismos distintos, con el fin de comprender cómo sus propiedades estructurales y bioquímicas se relacionan con su estabilidad y actividad catalítica.

En este contexto, surge la necesidad de establecer estrategias experimentales que permitan obtener estas proteínas en forma soluble y funcional, con el fin de caracterizarlas de manera integral para su posible uso en aplicaciones biotecnológicas y en futuros estudios de ingeniería de proteínas con fines industriales o académicos.

5. JUSTIFICACIÓN

En biología molecular y biotecnología, las polimerasas termoestables son herramientas fundamentales utilizadas en técnicas como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la clonación, la secuenciación y la biología sintética (Ishino & Ishino, 2014). En particular, las enzimas provenientes de arqueas o bacterias termófilas presentan ventajas como una mayor estabilidad térmica y, en muchos casos, actividad de corrección de errores, lo que incrementa la fidelidad de las reacciones de amplificación (Cline, 1996).

Sin embargo, la mayoría de los estudios se han centrado en polimerasas de organismos termofílicos, usualmente provenientes de arqueas, y que poseen diferentes propiedades como corrección de errores y alta termoestabilidad (Terpe, 2013), mientras que las polimerasas bacterianas, como la ADN polimerasa III, han sido menos exploradas desde una perspectiva bioquímica y estructural. Estos estudios han sido históricamente más teóricos o genéticos, y con menor énfasis en su caracterización biofísica (H. Maki et al., 1985). En organismos termófilos, como *Aquifex aeolicus*, aunque se ha identificado la maquinaria replicativa, incluyendo su subunidad α , la información

sobre su estabilidad, estructura, plegamiento y actividad catalítica es aún limitada (Bruck et al., 2002). Asimismo, existen pocos estudios comparativos y sistemáticos que analicen estas enzimas bajo condiciones homogéneas.

En este contexto, la caracterización entre una polimerasa mesófila, como la de *E. coli*, y una polimerasa termófila, como la de *A. aeolicus*, permitirá identificar determinantes moleculares asociados a la estabilidad térmica, el plegamiento y la actividad catalítica. Este enfoque comparativo no solo contribuye a una mejor comprensión de la relación estructura-función en proteínas, sino que también proporciona información clave sobre los mecanismos que permiten la adaptación a distintas condiciones ambientales.

La caracterización bioquímica y biofísica de la subunidad α de la ADN polimerasa III de ambos organismos, bajo condiciones experimentales comparables, permitirá establecer correlaciones entre estabilidad estructural y desempeño catalítico. Este conocimiento puede ser aprovechado para el diseño y optimización de enzimas con propiedades mejoradas, ampliando su potencial en aplicaciones biotecnológicas.

En conjunto, este estudio no solo aporta información fundamental sobre las propiedades bioquímicas y biofísicas de las polimerasas replicativas bacterianas, sino que también sienta las bases para futuras estrategias de ingeniería de proteínas dirigidas al desarrollo de herramientas más eficientes y robustas para uso científico e industrial.

6. HIPÓTESIS

Pregunta de investigación:

¿Qué diferencias en estabilidad térmica, plegamiento y actividad catalítica presenta la subunidad α de la ADN polimerasa III de *E. coli* y *A. aeolicus*, y cómo se relacionan estas propiedades entre sí?

Hipótesis:

La subunidad α de la ADN polimerasa III de *A. aeolicus* presenta mayor estabilidad térmica y mantiene su plegamiento estructural en condiciones más extremas que la de *E. coli*, mientras que ambas proteínas conservan características generales de su estructura secundaria y terciaria. Estas diferencias en estabilidad se reflejan en variaciones en su actividad catalítica.

7. OBJETIVOS

7.1. Objetivo general

Caracterizar las propiedades bioquímicas, estructurales y funcionales de la subunidad α de ADN polimerasas III de *E. coli* y *A. aeolicus* mediante técnicas biofísicas y ensayos catalíticos, con el fin de establecer relaciones estructura-función que permitan explorar su potencial en aplicaciones biotecnológicas futuras.

7.2. Objetivos específicos

1. Establecer, estandarizar y optimizar los protocolos de expresión y purificación de las ADN polimerasas III, con el fin de obtener enzimas en condiciones adecuadas de solubilidad, pureza, integridad y rendimiento para su análisis biofísico y funcional.
2. Caracterizar las propiedades bioquímicas y biofísicas de las polimerasas, evaluando su contenido de estructura secundaria (con dicroísmo circular), propiedades de estructura terciaria (a través de fluorescencia intrínseca y cristalografía de rayos X), y estabilidad y plegamiento (mediante calorimetría diferencial de barrido), para identificar semejanzas o diferencias estructurales entre ambas enzimas.
3. Determinar la actividad catalítica de las polimerasas mediante ensayos de PCR en tiempo real, estableciendo parámetros comparativos que permitan relacionar su desempeño catalítico con sus propiedades estructurales y su posible aplicación biotecnológica.

8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1. Materiales

8.1.1. Reactivos

Tabla 3. Reactivos utilizados y sus respectivas marcas comerciales.

Reactivo	Marca
Ácido acético glacial	J.T Baker
Acrilamida	Biorad
Agar bacteriológico	MCD LAB
Agarosa	Invitrogen
APS-Persulfato de amonio	Biorad
Azul brillante de comassie	Biorad
Azul de bromofenol	Biorad
Bisacrilamida	Biorad
Bis-Tris	SIGMA
Blue Prestained Protein Standar, Broad Range (11-250 kDa)	New England Biolabs
BLUEstain TM Protein Ladder (11-245 kDa)	Gold-Bio
Cloruro de magnesio	J.T Baker
Cloruro de sodio	J.T Baker
dNTPs	New England Biolabs
DTT	Gold-Bio
EDTA	SIGMA
Etanol	J.T Baker
EvaGreen Dye 20x	Gold-Bio
Fosfato de sodio dibásico	J.T baker
Glicerol	J.T Baker
HCl	SIGMA
Imidazol	SIGMA

IPTG	Gold-Bio
Kanamicina	Toku-E
KAPA SYBR FAST ROX Low (50x)	Kapa biosystems
Levadura	BDDIFCO
Metanol	J.T Baker
PMSF	Thermo Scientific
SDS	SIGMA
Sulfato de amonio	J.T.Baker
TEMED	rpi
Triptona	BDDIFCO
Tris base	SIGMA
Triton X-100	Molecular SIGMA biology
T7 promoter	Eurofins Genomics
5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3'	
T7 terminator	Eurofins Genomics
5'GCT AGT TAT TGC TCA GCG G-3'	
1 kb DNA Ladder	New England BioLabs

8.1.2. Buffers y soluciones

Tabla 4. Buffers y soluciones utilizados en la metodología y sus respectivos componentes.

Buffer / Solución	Componentes
Buffer A1 IMAC (lisis, equilibrio)	20 mM Tris-HCl pH 8.0, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol
Buffer B1 IMAC (elución)	20 mM Tris-HCl pH 8.0, 300 mM NaCl, 500 mM Imidazol
Buffer A2 AEx (lisis, equilibrio)	20 mM Tris-HCl pH. 8.0
Buffer B2 AEx (elución)	20 mM Tris-HCl pH. 8.0, 1 M NaCl

Buffer C SEC (lisis, SEC equilibrio, DSC, cristalografía)	20 mM Tris-Hcl pH 8.0, 150 mM NaCl
Buffer D precipitación sulfato de amonio (lisis, precipitación)	20 mM Tris-HCl pH 8.0, 300 mM NaCl
Buffer E dicróismo circular	10 mM fosfato de sodio pH 8.0, 15 mM NaCl
Buffer F	35 mM Fosfato de sodio, 300 mM NaCl, pH 8.0
4x SDS buffer de carga	0.2 M Tris-HCl pH 6.5, glicerol 4.3 M, SDS 8.9%, DTT 0.4 M, azul de bromofenol 6 mM
Acrilamida 30%	30% p/v acrilamida, 0.8% m/v bisacrilamida, H ₂ O
Buffer separador	18.17% m/v Tris base, 4% SDS al 10% pH 8.8, H ₂ O
Buffer concentrador	6.06% m/v Tris base, 4% SDS al 10% pH 6.8, H ₂ O
10x Laemmli buffer	144 g glicina, 30 g tris base, 10 g SDS, H ₂ O
Solución teñidora	50% v/v Etanol, 10% v/v ácido acético glacial, 40% v/v H ₂ O, 0.2% m/v azul brillante de Coomassie
Gel concentrador 10% (2 geles)	2 ml H ₂ O, 600 µL acrilamida al 30%, 888 µL buffer concentrador, 28 µL persulfato de amonio al 10%, 5 µL TEMED
Gel separador 10% (2 geles)	3.10 ml H ₂ O, 2.4 ml acrilamida 30%, 1.9 ml buffer separador, 112 µL persulfato de amonio al 10%, 5 µL TEMED
Solución desteñidora	50% metanol, 7.5% ácido acético glacial, 42.5% H ₂ O
Buffer ensayo 1	500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl, 1% Tritón X-100, pH 9.0
Buffer ensayo 2	150 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, pH 8.5
Buffer de almacenamiento	50% glicerol, 50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 5 mM DTT, 1% Triton X-100 pH 8.5

8.1.3. Medios de cultivo

Tabla 5. Medios de cultivos utilizados y sus componentes.

Medio	Componentes
Medio LB Agar	1% m/v triptona, 0.5% m/v extracto de levadura, 0.5% m/v NaCl, 2% Agar bacteriológico pH 7.0
Medio LB	1% m/v triptona, 0.5% m/v extracto de levadura, 0.5 % m/v NaCl pH 7.0

8.1.4. Cepas y vectores

Tabla 6. Cepas y vectores con sus respectivos genotipos y descripciones.

Cepa/ Vectores	Genotipo/Descripción
<i>E. coli</i> One Shot™ BL21 Star™ (DE3)	F- ompT hsdSB (rB-mB-) gal dcm rne131(DE3)
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	F- ompT gal dcm lon hsdSB(rB- mB-) [malB+]K-12(λS)
<i>E. coli</i> Rosetta (DE3)	F- ompT hsdSB(rB- mB-) gal dcm (DE3) pRARE (CamR)
pET-28a(+)	Vector bacteriano con un marcador de resistencia a la kanamicina para la expresión de proteínas marcadas con 6xHis en el extremo N-terminal y con un sitio de corte de trombina
pET-24(+)	Vector bacteriano con un marcador de resistencia a la kanamicina para la expresión inducible de genes con señales de traducción bacterianas sin etiquetas de fusión añadidas

8.1.5. Kits y consumibles

Tabla 7. Kits utilizados y consumibles con su respectiva marca comercial.

Kits y consumibles	Marca
Filtro de ultracentrífuga Amicon®, MWCO 50 kDa 15 mL	Merck
Filtro de ultracentrífuga Amicon®, MWCO 30 kDa 4 mL	Merck
Filtro de ultracentrífuga Amicon®, MWCO 30 kDa 0.5 mL	Merck
Microplacas de qPCR 96 pocillos	Merck
MF-Millipore TM 0.22 µm MCE membrana 47 mm	Merck
Película de sellado	Merck
PVDF Filtro de jeringa 0.22 µm 25 mm	Cobetter
QIAprep® Spin Miniprep Kit	QIAGEN
Spectra/Por® 2 membrana de diálisis estandar RC Tubing MWCO 12-14 kD	Spectrum

8.1.6. Equipos

Tabla 8. Equipo de laboratorio utilizado y su marca comercial.

Equipo de laboratorio	Marca
Agitador magnético	Corning
ÄKTA FPLC	GE Healthcare Life Sciences
ÄKTA go™	Cytiva
Balanza classic light	Mettler Toledo
Bloque térmico	Eppendorf
Calorímetro capilar VP-Capillary DSC	Microcal ®
Cámara digital DMC-ZS10	Panasonic

Centrifuga Avanti™ J-25	Beckman Coulter
Centrifuga 5418 R	Eppendorf
Centrifuga 5804 R	Eppendorf
Cubeta para espectrofotómetro	Sigma
C25KC Incubadora con agitación refrigerada	New Brunswick Scientific
Espectrofluorómetro PC1	ISS ®
Espectropolarímetro Chirascan™	Applied Photophysics ®
HisTrap™ HP column 5 mL	Cytiva
HiTrap™ Q FF 5 mL	Cytiva
Incubadora con agitación G-25	New Brunswick Scientific
Incubadora 1535	VWR Scientific
I2R Glow Box GB 11.8	Instruments for Research and Industry
Medidor de densidad celular Ultrospec 10	Amersham Biosciences
Medidor de pH modelo 220	Denver Instrument
Nano drop	
PIPETMAN® pipetas 1-10 µL, 50-200 µL, 200-1000 µL	Gilson
Rotor JA 10	Beckman Coulter
Rotor JA 25.50	Beckman Coulter
Rotor 50.2 Ti	Beckman Coulter
SE250 Mighty Small II Mini Vertical Protein Electrophoresis Unit	Hoefer
Sistema Peltier	PolyScience ®

Sonicador Branson 250	Branson
StepOnePlus Termociclador	Applied Biosystems
Superdex® 200 Increase 10/300 GL	Cytiva
Ultracentrifuga Optima XL-100 K	Beckman Coulter
Vortex-Genie 2 Laboratory Mixers	Daigger Scientific

8.1.7. Software

Tabla 9. Herramientas de software utilizados y aplicación.

Software utilizado	Aplicación
OriginLab (ver. 7; OriginLab Corporation)	Análisis de datos de DSC
PyMOL (ver. 4.5; DeLano Scientific LLC, Schrödinger Inc.)	Visualización de proteínas y realización de figuras relacionadas con estructuras tridimensionales
Rstudio (ver. 2025.01.2+418; Posit Team)	Generación de gráficos y análisis
SnapGene Viewer (ver. 8.2; SnapGene)	Visualización de plásmidos

8.2. Métodos

Para realizar este proyecto se utilizaron plásmidos previamente clonados y secuenciados, el plásmido pET-28a(+) con el gen *dnaE* de *Escherichia coli* con una mutación A22M-N71Q que para fines de este proyecto se nombró Pol-III-EcMut y el plásmido pET-24(+) con el gen homólogo *dnaE* de *Aquifex aeolicus* que se nombró Pol-III-Aa. La integridad de ambos constructos fue verificada mediante secuenciación completa de plásmido (PlasmidSaurus), confirmando la identidad de las secuencias y la ausencia de mutaciones adicionales.

8.2.1. Transformación de células quimiocompetentes

Se seleccionaron distintas cepas de *E. coli* con el fin de evaluar su eficiencia de expresión, considerando características como la disponibilidad de tRNAs para codones raros y la estabilidad del ARN mensajero.

El plásmido pET-28a(+) con el *dnaE* mutado de *E. coli* fue transformado en distintas cepas quimio competentes de *E. coli*: BL21 DE3 y Rosetta. El plásmido pET-24(+) con el gen *dnaE* de *A. aeolicus* fue transformado en cepas quimio competentes de *E. coli*: BL21 DE3, Rosetta y BL21Star.

Para las transformaciones, se tomaron alícuotas de 100 µl de células quimiocompetentes almacenadas a -80 °C. Se dejaron reposar en hielo durante 5–10 minutos y se añadieron 100 ng del ADN plasmídico correspondiente. Se incubaron las células por 10 minutos y luego se sometieron a un choque térmico a 42 °C en un thermoblock durante 45 segundos. Posteriormente, se regresaron las células al hielo por 5 minutos y se añadieron 900 µl de medio LB a cada transformación. Después, se dejó incubar la mezcla por una hora a 37 °C para su recuperación y luego se plaquearon 150 µl en cajas de LB agar que contenían 30 µg/mL de kanamicina (Kan), y se dejó incubar toda la noche a 37 °C.

8.2.2. Expresión proteica

Para los ensayos de expresión de ambas proteínas se realizaron inicialmente inducciones de 50 mL de volumen, probando diferentes temperaturas, distintas concentraciones de IPTG y varios tiempos de expresión, tal como se indica a continuación.

Expresión de Pol-III-EcMut

La proteína Pol-III-EcMut se indujo inicialmente en las cepas Rosetta y BL21 (DE3) a una concentración de 1 mM de IPTG durante 20 horas a 20 °C y 200 rpm de agitación (C25KC Incubadora con agitación refrigerada). Posteriormente, se volvió a inducir en la cepa Rosetta a una concentración de 3 mM de IPTG durante 20 horas a 20 °C y 37 °C a 200 rpm. El último ensayo de inducción se llevó a cabo nuevamente en la cepa Rosetta a una

concentración de 2 mM de IPTG a 25 °C y 200 rpm (C25KC Incubadora con agitación refrigerada) durante 4 y 20 horas de inducción, respectivamente.

El protocolo consistió en crecer una colonia de la cepa transformada en 5 mL de medio LB + Kan (30 µg/mL) durante toda la noche a 37 °C y 250 rpm de agitación. Al día siguiente se inoculó un matraz con 50 mL de medio LB + Kan (30 µg/mL) a una DO_{600nm} de 0.05, usando el cultivo de la noche anterior. Este cultivo principal se dejó incubando a 37 °C y 200 rpm hasta alcanzar una DO_{600nm} de 0.6–0.8. Una vez alcanzada esta densidad óptica, se indujo la expresión agregando isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) en las concentraciones y tiempos correspondientes.

Para analizar las distintas condiciones de expresión se tomaron muestras del cultivo sin inducir y después de la inducción, así como del pellet y del sobrenadante tras la sonicación. Para ello, el cultivo inducido se centrifugó en un tubo de 50 mL durante 10 minutos a 8000 rpm y 4 °C (Centrifuga 5804 R); posteriormente se resuspendió el pellet en 40 mL de buffer “F” adicionando 0.2 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) como inhibidor de proteasas, para la posterior sonicación. Esta consistió en 4 ciclos de 1 minuto con descansos de 1 minuto entre ciclos, a una potencia de 4 e intensidad de 40% (Sonicador 250). Después de sonicar, se centrifugó a 8700 rpm (Centrifuga 5804 R) durante 15 minutos a 4 °C para obtener las fracciones de pellet y sobrenadante. El siguiente paso fue analizar estas fracciones en geles de poliacrilamida al 10%.

Expresión de Pol-III-Aa

Por otro lado, la Pol-III-Aa se indujo a una concentración de 1 mM en las cepas BL21 (DE3), Rosetta y BL21 Star, y se incubó por 20 horas a 20 °C y 200 rpm (C25KC Incubadora con agitación refrigerada), siguiendo el mismo protocolo utilizado anteriormente para la Pol-III-EcMut. Finalmente, una vez definida la cepa óptima para expresar las proteínas, así como las mejores condiciones de expresión, se continuó con el escalamiento del proceso.

8.2.3. Sobre expresión de proteína soluble

Obtención de Pol-III-EcMut

Para la expresión de la proteína Pol-III-EcMut se inoculó una colonia del plásmido transformado en la cepa *E. coli* Rosetta (DE3) en un cultivo de 50 mL de medio LB + Kan, el cual se incubó a 37 °C y 250 rpm durante toda la noche. Al día siguiente se inocularon matraces con un volumen de 1 L de medio LB + Kan a una DO_{600 nm} de 0.05 utilizando el cultivo nocturno, y se incubaron en un agitador a 200 rpm y 37 °C hasta alcanzar una DO de 0.6–0.8. Posteriormente se tomó una muestra antes de la inducción y se agregó IPTG a una concentración de 2 mM a cada matraz. Los cultivos se incubaron a 25 °C durante 4 horas en un agitador a 200 rpm; una vez transcurrido este tiempo se tomó una muestra del cultivo inducido. Para la recolección del pellet, el medio inducido se centrifugó a 4500 rpm durante 20 minutos a 4 °C (Centrifuga Avanti™ J-25, rotor JA-10) y los pellets se almacenaron a –20 °C hasta su uso.

Obtención de Pol-III-Aa

Para la expresión de Pol-III-Aa, primeramente, se inoculó una colonia del plásmido transformado en la cepa *E. coli* BL21 Star (DE3) en un cultivo de 50 mL de medio LB + Kan, que se incubó a 37 °C y 250 rpm durante toda la noche. Al día siguiente se inocularon matraces con un volumen de 1 L de medio LB + Kan a una DO_{600 nm} de 0.05 usando el cultivo de la noche anterior, y se incubaron en un agitador a 200 rpm y 37 °C hasta alcanzar una DO de 0.6–0.8. Posteriormente, se tomó una muestra antes de la inducción y se agregó IPTG a una concentración de 1 mM a cada matraz. Los cultivos se incubaron a 20 °C durante 20 horas en un agitador a 200 rpm; una vez finalizado el tiempo de inducción se tomó una muestra del cultivo inducido. Para la recolección del pellet, el medio inducido se centrifugó a 4500 rpm (Centrifuga Avanti™ J-25, rotor JA-10) durante 20 minutos a 4 °C y los pellets se almacenaron a –20 °C hasta su uso.

8.2.4. Lisado celular y confirmación de expresión por SDS-PAGE.

Las proteínas solubles se recuperaron del pellet celular mediante sonicación. El pellet de Pol-III-EcMut se resuspendió en 25 mL de buffer “A1” y las células se lisaron por

sonicación en frío 4 veces por dos minutos, con dos minutos de descanso entre cada ciclo, a una potencia de 4 y una intensidad de 40% (Sonicador Branson 250). Después de la sonicación, la muestra se clarificó mediante centrifugación a 10,000 rpm durante 15 minutos a 4 °C (Centrifuga Avanti™ J-25, rotor JA-25.50) y el sobrenadante se ultracentrifugó a 25,000 rpm durante 1 hora a 4 °C (Ultracentrifuga Optima XL-100 K, rotor 50.2 Ti). Finalmente se tomaron muestras tanto del sobrenadante como del pellet resuspendido en el mismo buffer, las cuales corresponden a la fracción soluble e insoluble, respectivamente.

Para la Pol-III-Aa, los pellets se resuspendieron en buffer “D”. Las células también se lisaron por sonicación en frío, 4 veces durante dos minutos, con dos minutos de descanso entre cada ciclo, usando una potencia de 4 y una intensidad de 40% (Sonicador Branson 250). Posteriormente la muestra se clarificó mediante centrifugación 10,000 rpm durante 15 minutos a 4 °C (Centrifuga Avanti™ J-25, rotor JA-25.50) y el sobrenadante se ultracentrifugó a 25,000 rpm durante 1 hora a 4 °C (Ultracentrifuga Optima XL-100 K, rotor 50.2 Ti). Finalmente, se tomaron muestras del sobrenadante y del pellet resuspendido en el buffer de precipitación (muestras de fracción soluble a insoluble).

Para confirmar el nivel de expresión de ambas proteínas, 20 µL de las muestras colectadas durante el proceso de purificación se mezclaron con 10 µL de buffer de carga SDS-PAGE 4x. Las muestras se calentaron a 95 °C durante 5 minutos y se cargaron 5–10 µL en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) al 10%, junto con un marcador de peso molecular (ya sea Blue Prestained Protein Standard, Broad Range (11–250 kDa) de New England Biolabs o BLUEstain™ Protein Ladder (11–245 kDa) de GOLDBIO). Los geles se corrieron a corriente eléctrica constante (15 mA) con buffer Laemmli 1x en una cámara de electroforesis SE250 Mighty Small. Después los geles se tiñeron con solución teñidora en agitación a temperatura ambiente, y posteriormente se pasaron a solución para poder visualizarlos. Finalmente, los geles fueron fotodocumentados utilizando un transiluminador de luz blanca (I2R Glow Box GB 11.8) y una cámara digital (Panasonic DMC-ZS10) para su posterior análisis.

8.2.5. Purificación de proteínas

Las estrategias de purificación se diseñaron considerando las propiedades fisicoquímicas de la proteína, incluyendo su posible estabilidad térmica.

Purificación de Pol-III-EcMut

Para purificar esta polimerasa, se filtró el sobrenadante obtenido tras la sonicación (PVDF Filtro de jeringa 0.22 μ m) y se cargó en una columna de afinidad HisTrap™ HP 5 mL acoplada a un sistema FPLC. La columna se equilibró con buffer “A1” IMAC y se eluyó con el buffer “B1” utilizando un gradiente lineal. Las fracciones de elución se analizaron mediante SDS-PAGE al 10%. Las fracciones con mayor concentración de proteína y pureza se recolectaron y se concentraron por ultrafiltración (filtro de ultracentrífuga Amicon®, MWCO 50 kDa) para los siguientes pasos de purificación.

Dichas fracciones se dializaron en buffer “C” antes de filtrarlas e introducirlas en una columna Superdex® 200 Increase 10/300 GL acoplada a un sistema FPLC. Las fracciones eluidas se analizaron por SDS-PAGE al 10% y se juntaron las fracciones con mayor cantidad de proteína y pureza. Finalmente, el último paso de purificación consistió en una cromatografía de intercambio aniónico utilizando una columna HiTrap™ Q FF 5 mL acoplada a un sistema FPLC y buffer “A2” de AEX. La proteína purificada se eluyó con el buffer “B2” de AEX. Las fracciones más puras se recolectaron y se concentraron (filtro de ultracentrífuga Amicon®, MWCO 30 kDa 4 mL) para los ensayos posteriores. La proteína se almacenó a 4°C hasta los experimentos siguientes.

Purificación de Pol-III-Aa

La Pol III de *A. aeolicus* se purificó utilizando diversas técnicas bioquímicas. Dado que esta proteína no posee una etiqueta de histidinas, el primer paso de purificación fue una precipitación con sulfato de amonio, un método que permite fraccionar proteínas y purificarlas parcialmente, ya que distintas proteínas, enzimas, lípidos o ácidos nucleicos precipitan a diferentes saturaciones.

Para la precipitación se midió el volumen del sobrenadante obtenido tras la ultracentrifugación y se molió sulfato de amonio seco. El sulfato de amonio se agregó al

sobrenadante en un vaso con hielo, agitando lentamente hasta alcanzar una saturación del 30%, utilizando una tabla de fracciones de sulfato de amonio (Anexo, Tabla 14). La mezcla se dejó precipitando toda la noche a 4 °C y al día siguiente se centrifugó a 10,000 rpm (Centrifuga Avanti™ J-25, rotor JA-25.50) durante 30 minutos a 4 °C. Los mismos pasos se repitieron para saturaciones del 60% y 90%. Finalmente, los pellets se resuspendieron en el mismo buffer “D” y se analizaron con SDS-PAGE al 10% para determinar el porcentaje óptimo de precipitación, resultando en 60% donde precipitó la mayor cantidad de proteína de interés.

Después de la precipitación, la muestra se dializó en el buffer “A2” de AEX y se filtró con un filtro (PVDF Filtro de jeringa 0.22 µm) antes de cargarla en una columna HiTrap™ Q HP acoplada a un sistema FPLC. La proteína de interés se eluyó con un gradiente lineal de buffer “B2” de AEX. Las fracciones con mayor cantidad de proteína se concentraron y se pasaron por una columna Superdex® 200 Increase 10/300 GL acoplada a un sistema FPLC para realizar cromatografía por exclusión de tamaño (SEC) con elución isocrática usando el buffer “C”. Finalmente, dada la naturaleza termófila de la proteína, se llevó a cabo una purificación por calor, en la que la proteína se calentó a 85 °C durante 4 minutos; posteriormente se centrifugó a 14,000 rpm (Centrifuga 5418 R) durante 30 minutos y se recuperó el sobrenadante. Este paso se basa en la estabilidad térmica de proteínas provenientes de organismos termófilos, lo que permite eliminar proteínas contaminantes menos estables. La proteína pura se almacenó a 4°C hasta su posterior uso.

8.2.6. Determinación de la concentración de proteína.

Para medir la concentración de las proteínas mediante su absorbancia a 280 nm se utilizó un NanoDrop con un microvolumen de 2.5. El peso molecular y el coeficiente de absortividad molar (ϵ) se obtuvieron del servidor ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>). La concentración de proteína se calculó a partir de la absorbancia a 280 nm utilizando el coeficiente de extinción molar teórico, aplicando la ley de Beer–Lambert. Se utilizó el buffer correspondiente como blanco para las mediciones.

$$A_{280} = \frac{\epsilon_{280} \times c \times d}{MW} \rightarrow c = \frac{A_{280} \times MW}{\epsilon_{280} \times d}$$

Donde:

A_{280} : absorbancia a 280 nm

ϵ_{280} : coeficiente de absortividad molar a 280 nm $\left[\frac{1}{M \times cm} \right]$

d : longitud de la celda en milímetros

MW : peso molecular teórico de la proteína $\left[\frac{g}{mol} \right]$

c : concentración de la proteína en $\left[\frac{mg}{mL} \right]$

8.2.7. Ensayos de termoestabilidad

Se realizaron pruebas de termoestabilidad en ambas proteínas a diferentes temperaturas y tiempos. Se tomó 1 mL de la proteína purificada y se colocó en un tubo Eppendorf de 1.5 mL. Posteriormente, las muestras se calentaron en un bloque térmico a 50 °C, 60 °C, 70 °C, 80 °C y 90 °C durante 1 minuto, 2 minutos 30 segundos y 5 minutos.

Después de calentar las muestras, estas se colocaron en hielo y posteriormente se centrifugaron a 14,000 rpm durante 30 minutos a 4°C (Centrifuga 5418 R) para obtener la fracción soluble e insoluble. Finalmente, dichas fracciones se analizaron por SDS-PAGE al 10%. Los geles fueron fotodocumentados utilizando un sistema de documentación de geles bajo luz blanca ((I2R Glow Box GB 11.8), para su posterior análisis. Los resultados se analizaron de forma cualitativa al comparar la intensidad de la banda correspondiente a la proteína en la fracción soluble.

8.2.8. Dicroísmo circular (DC) en el UV lejano

Para analizar la estructura secundaria y el correcto plegamiento de las proteínas purificadas, se realizaron ensayos de dicroísmo circular en la región de UV lejano. Para

ello, ambas proteínas se dializaron exhaustivamente en buffer “E”. Se utilizó una muestra de cada proteína a una concentración de 0.3 mg/mL en una celda de cuarzo de 0.1 cm de paso de luz. Los espectros de DC se colectaron en espectropolarímetro Chirascan™ (Applied Photophysics®) acoplado a un sistema Peltier (PolyScience®) para el control de temperatura. Los espectros de dicroísmo circular se registraron en un rango de 190 a 260 nm, con un ancho de banda de 1 nm y 10 repeticiones a 20 °C. Tras su colecta, se realizó la corrección del espectro utilizando el buffer como blanco. Los datos se convirtieron a elipticidad residual media (MRE) utilizando la siguiente ecuación:

$$[\theta]_{MRE} = \frac{\theta \times MW}{10 \times c \times d \times (n - 1)}$$

donde:

$[\theta]_{MRE}$ =elipticidad residual media $\left[\frac{\text{deg} \times \text{cm}^2}{\text{dmol}} \right]$

Θ : elipticidad en mdeg

MW : peso molecular teórico de la proteína $\left[\frac{\text{g}}{\text{mol}} \right]$

c : concentración de la proteína en $\left[\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right]$

d : longitud de la cubeta en centímetros

n : número de aminoácidos

Los espectros de DC fueron analizados mediante deconvolución utilizando el servidor BeStSel (<https://bestsel.elte.hu/index.php>) (Micsonai et al., 2025), con el fin de estimar el contenido de estructura secundaria de las proteínas. Los resultados de estructura secundaria obtenidos por deconvolución fueron comparados con las predicciones estructurales generadas por AlphaFold, con el fin de evaluar la concordancia entre la estructura experimental y la predicha. Para esto, las estructuras predichas por AlphaFold fueron analizadas en PyMOL utilizando el script DSS para calcular el contenido de estructura secundaria.

8.2.9. Fluorescencia intrínseca (IF)

Se llevaron a cabo ensayos de fluorescencia para estudiar la estructura terciaria (a baja resolución) y la estabilidad de las proteínas. Las mediciones se realizaron en un espectrofluorómetro PC1 (ISS®) acoplado a un sistema Peltier (PolyScience®) para el control de temperatura. Se analizaron cambios en la longitud de onda máxima de emisión y en la intensidad de fluorescencia como indicadores de alteraciones estructurales.

La concentración de proteína fue de 0.3 mg/mL en el mismo buffer utilizado para D y a una temperatura de 20 °C. Se emplearon longitudes de onda de excitación de 280 y 295 nm, y la emisión se midió en un intervalo de 305 a 450 nm, monitoreando la intensidad de fluorescencia cada 1 nm, con slits de 0.5 cm de paso de luz tanto en los monocromadores de excitación y emisión.

8.2.10. Cristalografía de proteínas

Ambas proteínas se concentraron hasta una concentración aproximada de 13 mg/mL para Pol-III-Aa y 9.8 mg/mL para Pol-III-EcMut, mediante centrifugación utilizando dispositivos de ultrafiltración con un punto de corte de 30 kDa y 4 °C. Para la búsqueda de condiciones de cristalización, se realizaron placas de screening utilizando el método de difusión de vapor en gota sentada, utilizando placas de 96 pozos. La preparación de las gotas se realizó en una proporción 1:1 de proteína: solución del reservorio mediante un robot de cristalización (Crystal Gryphon, Art Robbins Instruments), utilizando los kits CrystalScreen 1-2, PEGRx 1-2 y Morpheus 3-4 (Hampton Research y Molecular Dimensions). Las placas de cristalización se incubaron a 20 °C y el progreso de la formación de cristales se monitoreó periódicamente mediante observación de las placas en un microscopio estereoscópico. Todos los experimentos se realizaron en el Laboratorio Nacional de Estructura de Macromoléculas (LANEM, sede Instituto de Química, UNAM). Al momento de la redacción de la presente tesis, no se observaron cristales bajo las condiciones evaluadas, por lo que no se presentan resultados correspondientes a esta sección.

8.2.11. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Para evaluar la termoestabilidad de las proteínas y sus parámetros termodinámicos asociados, se realizaron ensayos de calorimetría diferencial de barrido (DSC). Las mediciones se llevaron a cabo en un calorímetro capilar VP-Capillary DSC (MicroCal®) del Laboratorio de Biofisicoquímica de la Facultad de Química, UNAM. Los experimentos se efectuaron en un rango de temperatura de 20 °C a 100 °C, con una velocidad de barrido de 90 °C/h. Para esto, las proteínas se prepararon a una concentración de 1 mg/mL suspendidas en buffer “C”. A todas las endotermas se les realizó la corrección de línea base utilizando el buffer correspondiente (línea base física) y cada proteína se analizó por triplicado para asegurar la reproducibilidad de los resultados. Las endotermas fueron analizadas utilizando un modelo de no dos estados (non-two-state model) con transiciones independientes (Koch et al., 2024). Dado que este modelo solo es aplicable a transiciones sin ΔC_p , se sustrajo la línea base química de progreso de los datos experimentales. Todas las transiciones calorimétricas se ajustaron de acuerdo con las ecuaciones (1) y (2) (manual de MicroCal PEAQ-DSC) (*MicroCal PEAQ-DSC User Guide*, s/f)

$$\text{Ecuación 1} \quad C_p(T) = \frac{K_A(T)\Delta H^2}{[1+K_A(T)]^2 RT^2} + \dots,$$

$$\text{Ecuación 2} \quad K_A(T) = \exp\left\{\left[\frac{-\Delta H}{RT}\right] \times \left(1 - \frac{T}{T_m}\right)\right\},$$

donde T es la temperatura en cada punto de los datos, K_a es la constante de equilibrio, ΔH es la entalpía de Van't Hoff (correspondiente al cambio de entalpía de la unidad cooperativa que participa en cada transición), R es la constante universal de los gases, y T_m es la temperatura de fusión correspondiente al máximo de C_p para cada transición independiente (2 para ambas proteínas). Los datos calorimétricos fueron procesados y ajustados utilizando el software MicroCal PEAQ-DSC y la guía de análisis de datos de DSC.

8.2.12. Ensayos de actividad catalítica

Con el fin de evaluar la actividad catalítica de las DNA polimerasas, se realizaron ensayos de amplificación mediante PCR en tiempo real (qPCR) utilizando un termociclador StepOnePlus™ en formato de 96 pocillos, usando el colorante EvaGreen 20x y un volumen de reacción de 50 μ L. La actividad enzimática se evaluó cualitativamente a partir del cambio en la fluorescencia (ΔRn) durante la amplificación, como indicador de la síntesis de producto. Para esta evaluación se utilizaron 3 concentraciones variables de $MgCl_2$ (1 mM, 2 mM y 4 mM), 2 cantidades distintas de nanogramos del templado de ADN (longitud 276 pb) y distintas cantidades de cada polimerasa. La Pol-III-EcMut se usó a una concentración de 13.49 mg/ml, mientras la Pol-III-Aa se usó a una concentración de 32.3 mg/ml. De ambas proteínas se usaron 0.5 μ L, 1 μ L, 1.5 μ L y 2 μ L para las distintas reacciones. Para la Pol-III-EcMut esto corresponde a 6.7 μ g, 13.5 μ g, 20.2 μ g y 26.98 μ g de proteína respectivamente. Para la Pol-III-Aa estos volúmenes corresponden a 16.1 μ g, 32.3 μ g, 48.4 μ g y 64.6 μ g respectivamente. Se usó como control positivo la polimerasa 2xPCRBio TaqMix y dos controles negativos, uno sin polimerasa y uno sin plantilla de ADN.

Todas las reacciones se realizaron en buffer de ensayo 1 (1x). Posteriormente se llevó a cabo otra qPCR en el mismo equipo y mismas condiciones, pero esta vez usando como control positivo KAPA SYBR FAST DNA polimerasa y buffer de ensayo 2 (1x), además se utilizó ROX como referencia. La programación de qPCR fue de 30 segundos de desnaturalización inicial a 95°C, para los ciclos sucesivos 20 segundos a 95°C, 30 segundos a 43°C de alineamiento y 68°C durante un minuto para extensión, finalmente otros 5 min a 68°C para una extensión final, el programa se corrió por 40 ciclos (Figura 4).

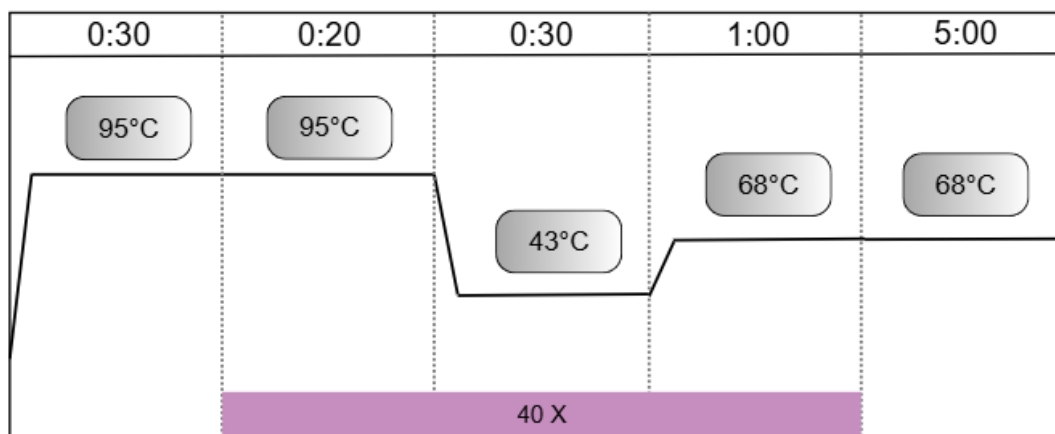


Figura 4. Programa de qPCR para análisis de actividad catalítica de Pol III.

9. RESULTADOS

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos de los ensayos de expresión y purificación de las proteínas, seguidos de su caracterización mediante pruebas de termoestabilidad, dicroísmo circular, fluorescencia intrínseca, calorimetría diferencial de barrido y ensayos de actividad catalítica.

9.1. Ensayos de expresión

9.1.1. Pol-III-EcMut presenta una mayor expresión soluble en la cepa Rosetta (DE3)

Se evaluó la expresión de la subunidad α de la Pol-III-EcMut en dos cepas de *E. coli* distintas: en BL21 (DE3) y Rosetta (DE3), bajo condiciones de inducción de 1 mM de IPTG, a 20°C durante 20 horas. Los resultados muestran que la proteína presenta una mayor expresión en la cepa Rosetta (DE3) en comparación con la cepa BL21 (DE3). Sin embargo, bajo estas condiciones la cantidad de proteína soluble obtenida es limitada (Figura 5).

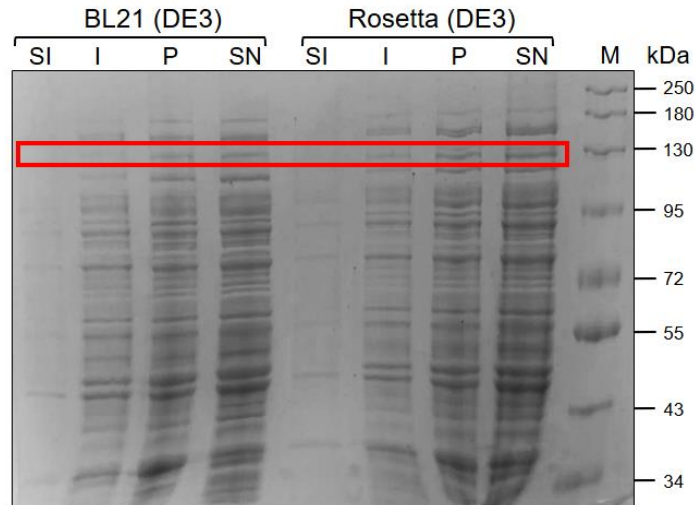


Figura 5. Expresión de la Pol-III-EcMut inducida con 1 mM de IPTG a 20 °C durante 20 horas en dos distintas cepas. SI: sin inducir, I: inducida, P: pellet, SN: sobrenadante, M: marcador de peso molecular. El recuadro rojo indica la región donde se espera observar la proteína de interés.

Posteriormente, se evaluó el efecto de aumentar la concentración de IPTG a 3mM y variar la temperatura de inducción hasta 37°C. Se observó que la expresión total de la proteína aumenta a 37°C, no obstante, la mayor parte de la proteína se localiza en la fracción insoluble (pellet), lo que sugiere la posible formación de agregados o cuerpos de inclusión (Figura 6). Por lo que fue necesario realizar más ensayos variando temperatura y tiempo de inducción, así como la concentración de IPTG. Al reducir la concentración de IPTG a 2 mM y realizar la expresión a una temperatura de 25°C, se evidencia que con 4 horas de expresión se obtiene la mayor cantidad de proteína en el sobrenadante (Figura 7).

Estos resultados indican que condiciones de inducción más suaves favorecen la solubilidad de la proteína, lo cual es consistente con la expresión de proteínas de gran tamaño o complejidad estructural.

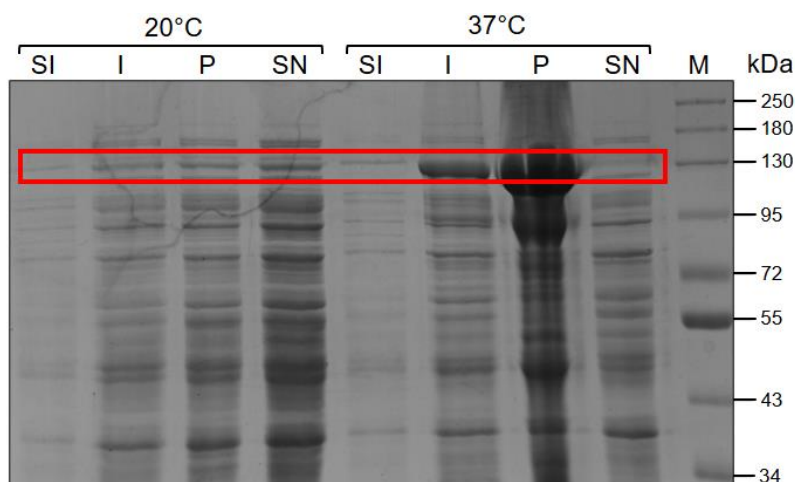


Figura 6. Expresión de la Pol-III-EcMut con 3 mM de IPTG durante 20 horas a distintas temperaturas en la cepa Rosetta (DE3). SI: sin inducir, I: inducida, P: pellet, SN: sobrenadante, M: marcador de peso molecular. El recuadro rojo indica la región donde se espera observar la proteína de interés.

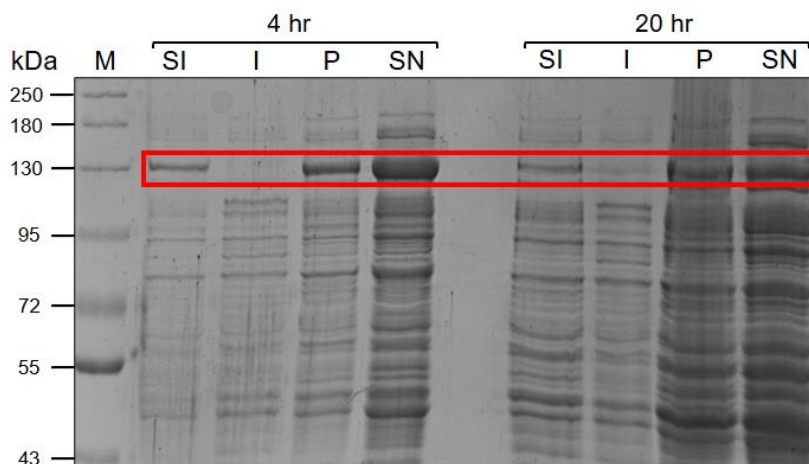


Figura 7. Expresión de la Pol-III-EcMut con 2 mM de IPTG a 25°C en la cepa Rosetta (DE3) durante distintos tiempos de incubación. SI: sin inducir, I: inducida, P: pellet, SN: sobrenadante, M: marcador de peso molecular. El recuadro rojo indica la región donde se espera observar la proteína de interés.

9.1.2. Pol-III-Aa presenta una mayor expresión soluble en la cepa BL21 Star (DE3)

Se evaluó la expresión de la subunidad α de la ADN Pol-III-Aa en 3 distintas cepas de *E. coli*: Rosetta (DE3), BL21 Star (DE3) y BL21 (DE3), bajo condiciones de inducción con 1 mM de IPTG a 20°C durante 20 horas. Los resultados muestran que la mayor expresión de la proteína se obtiene en la cepa BL21 Star (DE3) (Figura 8). En la cepa Rosetta (DE3) también se puede observar una buena expresión, mientras que en la cepa BL21 (DE3) la expresión de la proteína de interés es significativamente menor. En todas las

cepas evaluadas, la mayor parte de la proteína se encuentra en la fracción soluble (sobrenadante), lo que indica una adecuada solubilidad bajo estas condiciones. Debido a esto no fue necesario cambiar ninguna condición posteriormente ni realizar una optimización de los parámetros de expresión.

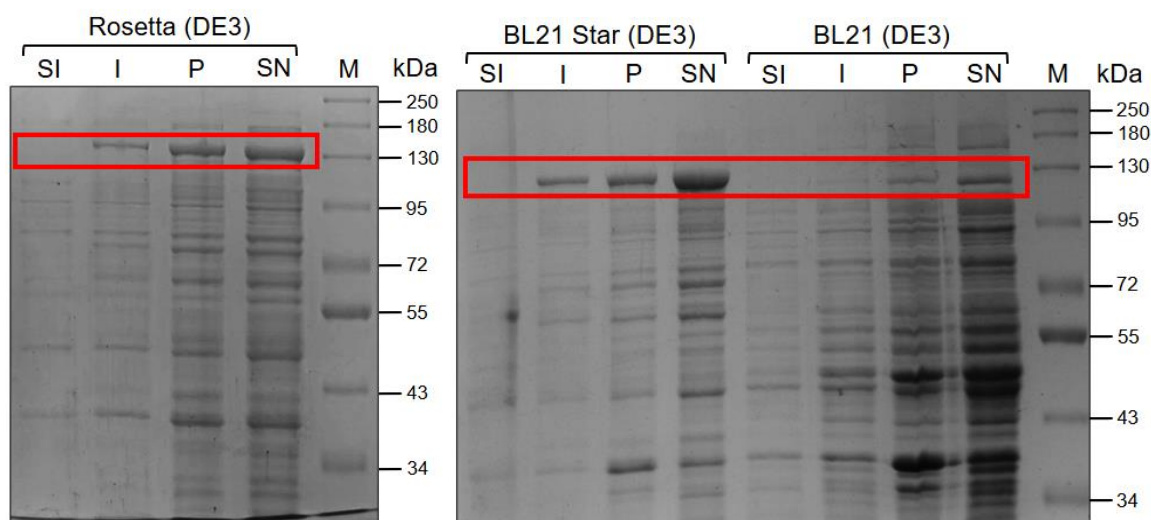


Figura 8. Expresión de la Pol-III-EcMut inducida con 1 mM de IPTG a 20°C en distintas cepas durante 20 horas de incubación. SI: sin inducir, I: inducida, P: pellet, SN: sobrenadante, M: marcador de peso molecular. El recuadro rojo indica la región donde se espera observar la proteína de interés.

Estos resultados contrastan con los obtenidos para la variante de *E. coli*, sugiriendo que la Pol III de *A. aeolicus* presenta una mayor tendencia a expresarse de manera solubles en el sistema heterólogo.

9.2. Estrategias diferenciales de purificación revelan propiedades bioquímicas distintas entre ambas polimerasas

9.2.1. Múltiples pasos cromatográficos permiten purificar la Pol-III-EcMut a homogeneidad

Una vez expresada exitosamente en la fracción soluble y obtenida la proteína en mayores volúmenes, se inició el proceso de purificación mediante cromatografía de afinidad a metales inmovilizados (IMAC), utilizando una columna His-Trap. Como se presenta en el cromatograma (Figura 9A), el trazo muestra un pico inicial correspondiente a proteínas no retenidas (flowthrough), seguido de una fase de lavado eficiente. La

proteína de interés eluyó como un pico definido al incrementar la concentración de Buffer “B1”, lo que indica una interacción específica con la resina. El análisis por SDS-PAGE (Figura 9B) muestra que la proteína purificada se encuentra en el pico principal, sin embargo, una fracción considerable de proteína se observó en el flujo inicial, lo que sugiere una unión incompleta a la columna. Además, las fracciones eluidas presentan aún otros contaminantes proteicos, por lo que se procedió a realizar otro paso de purificación a las fracciones no puras.

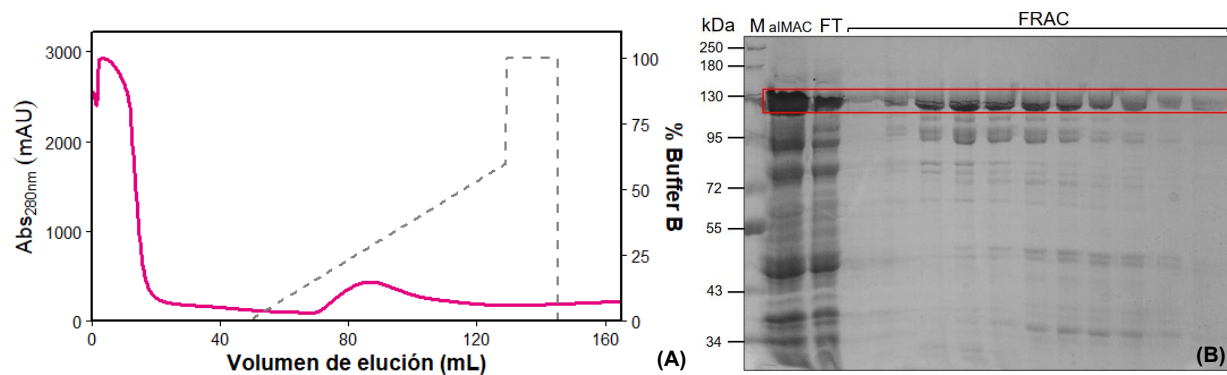


Figura 9. Purificación de la Pol-III-EcMut mediante IMAC. **(A)** Cromatograma de purificación. **(B)** Análisis por SDS-PAGE de las fracciones obtenidas. M: marcador de peso molecular, aIMAC: antes de IMAC, FT: flow through, FRAC: fracciones eluidas con mayor cantidad de proteína. El recuadro rojo indica la región donde se espera observar la proteína de interés.

Como siguiente paso de purificación, se realizó una cromatografía de exclusión por tamaño (SEC). En el cromatograma (Figura 10A) se identifica un pico principal con un ligero hombro a la izquierda; al correr estas fracciones en un gel SDS-PAGE (Figura 10B), se comprueba que en ambos picos está presente la proteína de interés. El primer pico tiene menor concentración de Pol III, sin embargo, las fracciones son más puras que el segundo pico. Aunque el segundo pico contiene la mayor cantidad de proteína, en estas fracciones aún se detectan otros contaminantes.

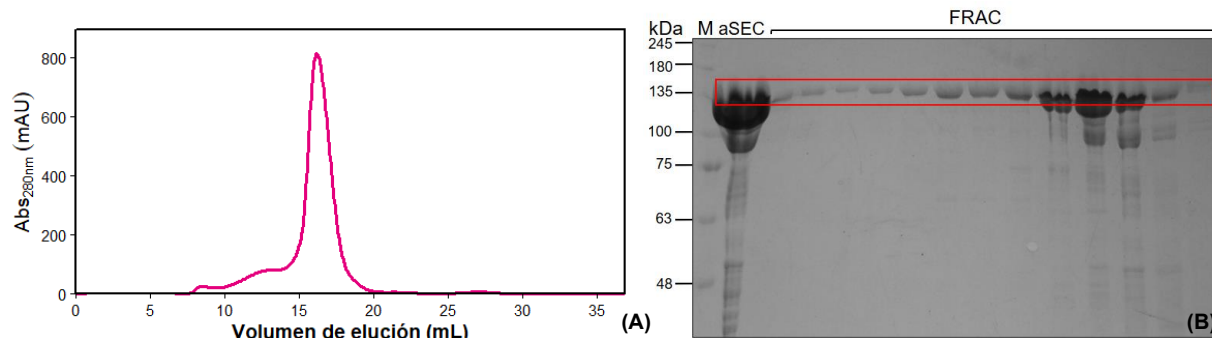


Figura 10. Purificación de la Pol-III-EcMut mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC). **(A)** Cromatograma de la purificación. **(B)** Análisis por SDS-PAGE. M: marcador de peso molecular, aSEC: antes de SEC, FRAC: fracciones del pico principal con mayor cantidad de proteína. El recuadro rojo indica la región donde se espera observar la proteína de interés.

Finalmente, como tercer y último paso de purificación de esta proteína, se realizó una cromatografía de intercambio aniónico con las fracciones aún contaminadas del paso anterior. En esta cromatografía la proteína eluyó a una concentración del 100% del gradiente con NaCl (Figura 11A) y el análisis por SDS-PAGE muestra una mejora significativa en el grado de pureza con una mínima cantidad de contaminantes restantes (Figura 11B).

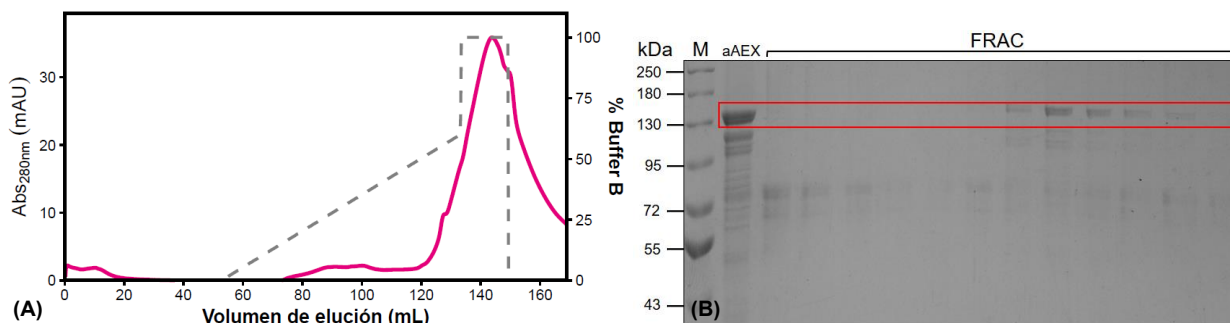


Figura 11. Purificación de la Pol-III-EcMut mediante cromatografía de intercambio aniónico (AEX). **(A)** Cromatograma de la purificación. **(B)** Análisis por SDS-PAGE. M: marcador de peso molecular, aAEX: antes de AEX, FRAC: fracciones del pico principal con mayor cantidad de proteína. El recuadro rojo indica la región donde se espera observar la proteína de interés.

9.2.2. La Pol-III-Aa sin etiqueta puede purificarse eficientemente mediante estrategias bioquímicas clásicas

Para la purificación de la Pol-III-Aa, el proceso fue diferente al de su contraparte mesófila, pues esta proteína no tiene etiqueta de histidinas, por lo que se comenzó el proceso de

purificación con una precipitación con sulfato de amonio. Para ello, se evaluaron distintos niveles de saturación (30%,60% y 90%) con el fin de determinar condiciones óptimas de precipitación de la Pol III. El análisis SDS-PAGE (Figura 12) muestra que la proteína de interés precipita principalmente a una saturación del 60 % lo que permitió seleccionar esta condición para los pasos posteriores.

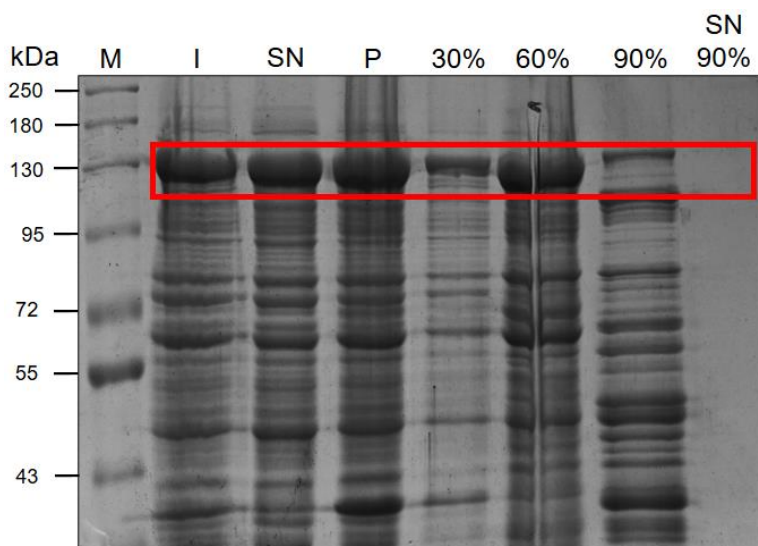


Figura 12. Análisis por SDS-PAGE de la precipitación con sulfato de amonio de la Pol-III-Aa. M: marcador de peso molecular, I: inducido, SN: sobrenadante, P: pellet, 30%,60%,90% son los pellets de los distintos porcentajes a los que se realizó la precipitación. El recuadro rojo indica la región donde se espera observar la proteína de interés.

Así, una vez obtenida la proteína del pellet de precipitación, se realizó una cromatografía de intercambio aniónico para purificar la proteína de interés. Durante ese paso de purificación, la proteína comenzó a eluir a una concentración alrededor de 25% del gradiente con NaCl (Figura 13A). Aunque una fracción importante de la proteína de interés se encuentra en el Flow-throw, se puede apreciar que aún se conserva suficiente proteína en las fracciones eluidas (Figura 13B).

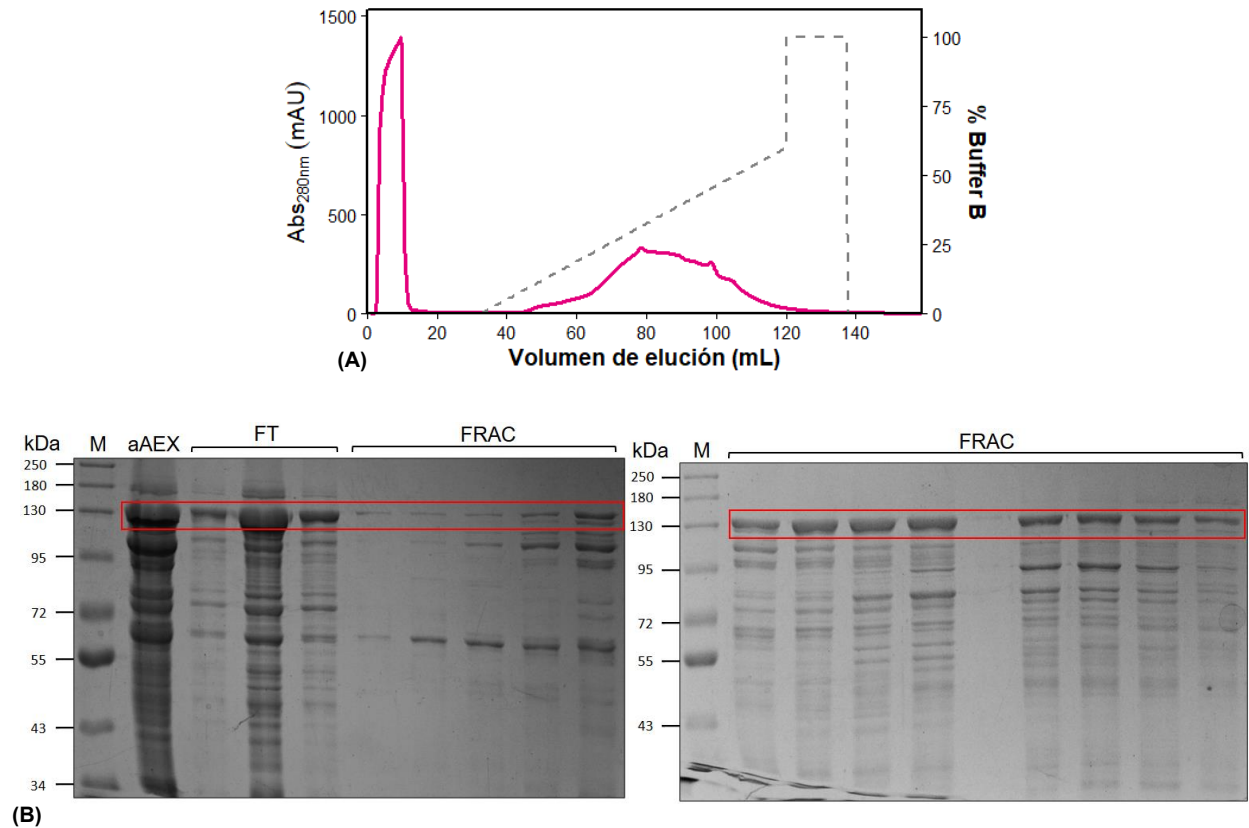


Figura 13. Purificación de la Pol-III-Aa mediante cromatografía de intercambio aniónico (AEX). **(A)** Cromatograma de la purificación. **(B)** Análisis de SDS-PAGE. M: marcador de peso molecular, aAEX: antes de AEX, FRAC: fracciones del pico principal con mayor cantidad de proteína. El recuadro rojo indica la región donde se espera observar la proteína de interés.

Posteriormente estas fracciones fueron sometidas a cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), obteniéndose un pico principal, aunque aún con la presencia de contaminantes proteicos del paso anterior. En este cromatograma (Figura 14A) se obtuvo un solo pico principal del cuál se obtuvieron fracciones con mayor porcentaje de pureza. (Figura 14B).

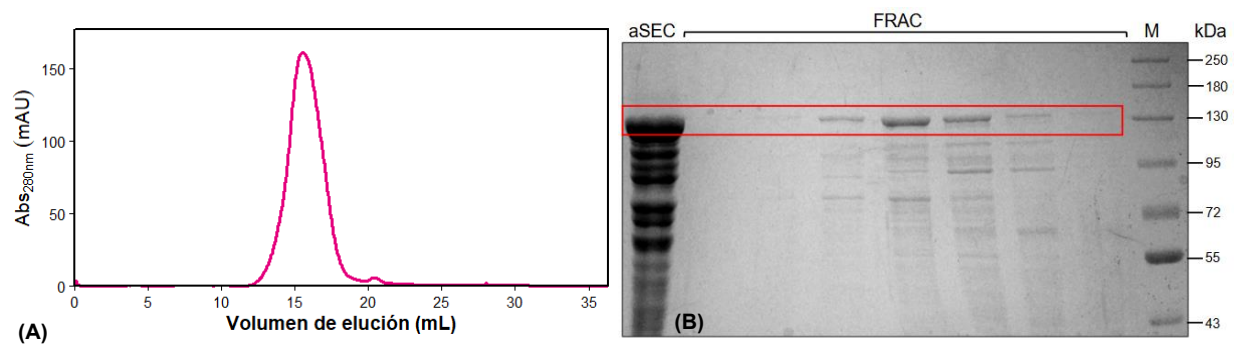


Figura 14. Purificación de la Pol-III-Aa por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC). **(A)** Cromatograma de la purificación. **(B)** Análisis SDS-PAGE. aSEC: antes de SEC, FRAC: fracciones del

pico con más cantidad de proteína, M: marcador de peso molecular. El recuadro rojo indica la región donde se espera observar la proteína de interés.

Finalmente, se realizó un paso adicional de purificación mediante tratamiento térmico a 85°C durante 4 minutos. Este procedimiento permitió eliminar contaminantes proteicos menos estables, enriqueciendo la muestra en la proteína de interés (Figura 15B), lo cual es consistente con la naturaleza termoestable de la proteína.

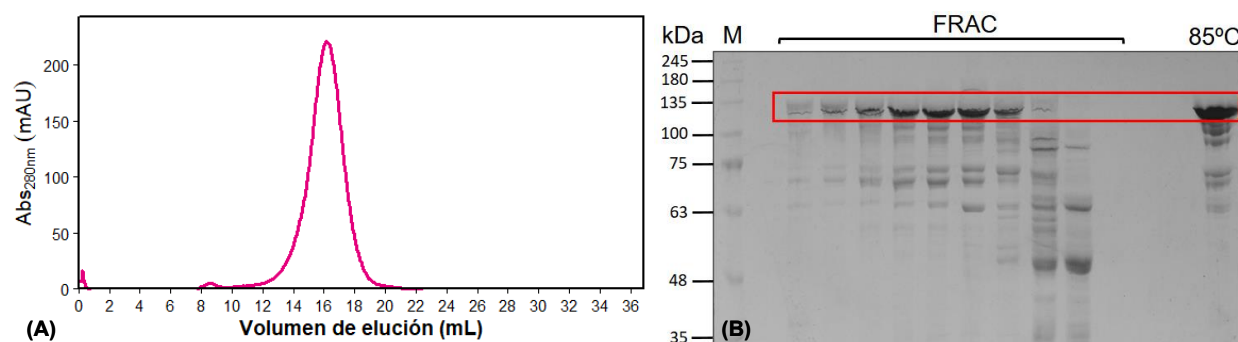


Figura 15. Purificación de la Pol-III-Aae mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) y choque térmico a 85°C. **(A)** Cromatograma de purificación. **(B)** Análisis por SDS-PAGE de las fracciones del pico de SEC y las mismas fracciones después de calentarlas para otro paso de purificación. M: marcador de peso molecular, FRAC: fracciones del pico, 85°C: la Pol III después de calentarla. El recuadro rojo indica la región donde se espera observar la proteína de interés.

9.3. Ensayos de termoestabilidad

9.3.1. La Pol-III-Aa mantiene estabilidad térmica y permite purificación por calor

Se evaluó la estabilidad térmica de la Pol-III-Aa mediante tratamientos a distintas temperaturas y tiempos de incubación. Al calentar la proteína de interés a 95°C durante intervalos de uno a diez minutos, se observó una progresiva pérdida de solubilidad, evidenciada por la acumulación de la proteína en el pellet de las muestras. A partir de los tres minutos el nivel de agregación es notoriamente mayor, a los diez minutos de exposición al calor la cantidad de proteína en el pellet disminuye y se puede apreciar una pequeña banda en el sobrenadante, lo que sugiere la presencia de una población parcialmente resistente a la desnaturalización térmica (Figura 16).

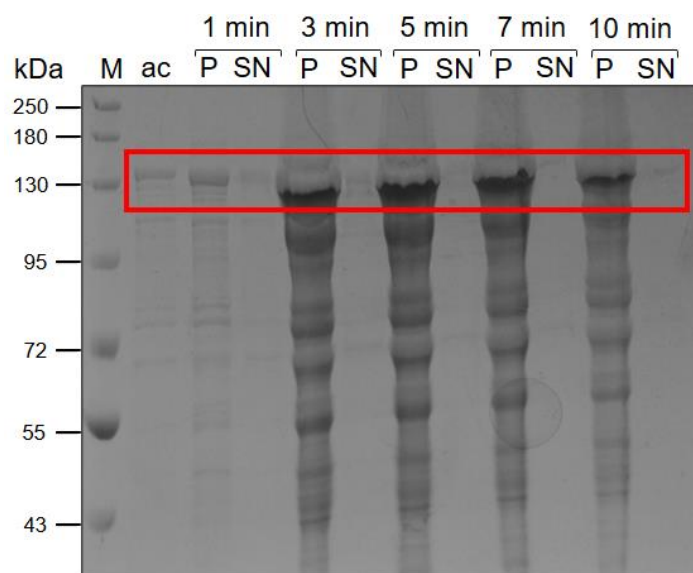


Figura 16. Análisis por SDS-PAGE del tratamiento térmico de la Pol-III-Aa a 95°C durante 1,3,5,7 y 10 minutos. M: marcador de peso molecular, ac: antes de calentar, P: pellet, SN: sobrenadante. El recuadro rojo indica la región donde se espera observar la proteína de interés.

Con base a estos resultados, se hicieron otras pruebas de tratamiento térmico, pero esta vez a tres distintas temperaturas, con intervalos cortos de tiempo de un minuto y cuatro minutos. Al calentar las muestras con la proteína de interés durante un minuto a 70°C, 80°C y 90°C, no se aprecia ninguna diferencia significativa entre las bandas de estas tres temperaturas. No obstante, al calentar la proteína durante cuatro minutos, se detecta una reducción progresiva de otros contaminantes proteicos con el incremento de la temperatura. A los 90°C la proteína de interés se mantiene como la banda predominante, eliminando casi por completo los demás contaminantes, indicando una mayor estabilidad frente a otras proteínas presentes en la nuestra (Figura 17).

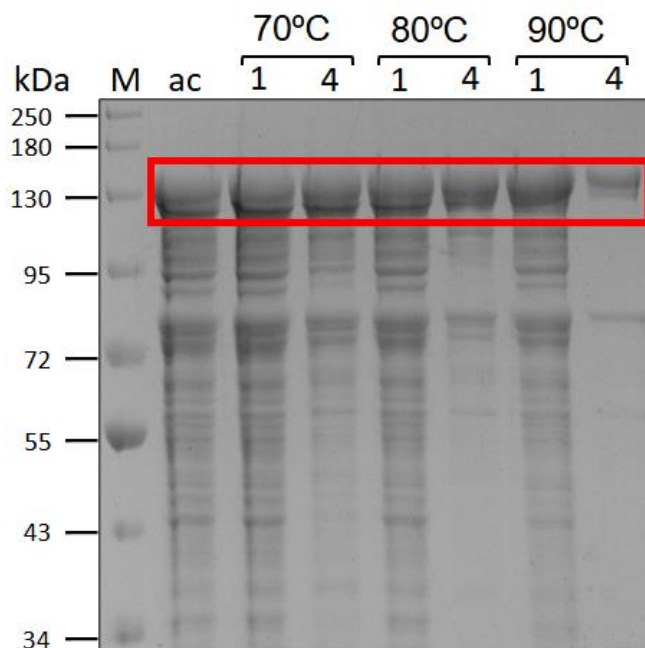


Figura 17. Análisis por SDS-PAGE del sobrenadante de la Pol-III-Aa después del tratamiento térmico a 70°C, 80°C y 90°C durante 1 y 4 minutos. M: marcador de peso molecular, ac: antes de calentar, 1:1 minuto, 4: 4 minutos. El recuadro rojo indica la región donde se espera observar la proteína de interés.

Estos resultados se confirmaron mediante ensayos adicionales utilizando un mayor rango de temperaturas, y tres distintos tiempos de incubación. Al calentar a temperaturas bajas (50°C y 60°C), no se observan diferencias significativas en las bandas. Sin embargo, al calentar la proteína a 70°C durante cinco minutos, se evidencian menos bandas pertenecientes a otros contaminantes proteicos. Asimismo, a los 80°C y 90°C se obtiene una muestra con muchos menos contaminantes. Específicamente después de calentar la proteína durante cinco minutos a 90°C, se aprecia que la banda principal pertenece a la Pol III y se muestra con un grado alto de pureza (Figura 18).

En conjunto, estos resultados indican que la Pol-III-Aa presenta una elevada estabilidad térmica relativa, lo que permite su purificación mediante tratamiento térmico, aprovechando la eliminación selectiva de proteínas menos estables.

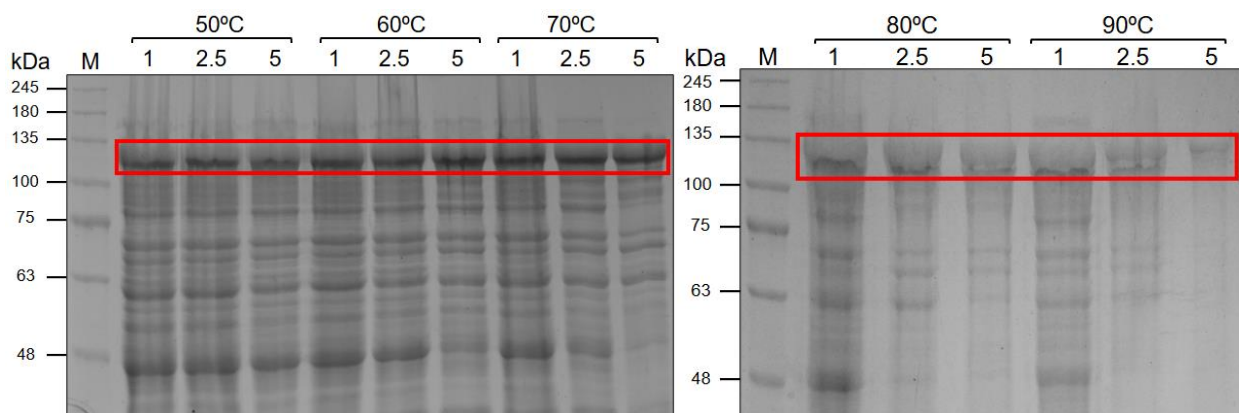


Figura 18. Análisis por SDS-PAGE del sobrenadante de la Pol-III-Aa después del tratamiento térmico a 50°C, 60°C, 70°C, 80°C y 90°C durante 1, 2.5 y 5 minutos. M: marcador de peso molecular. El recuadro rojo indica la región donde se espera observar la proteína de interés.

9.3.2. La Pol-III-EcMut presenta menos estabilidad térmica y rápida pérdida de solubilidad

En contraste a lo observado con la Pol-III-Aa, la Pol-III-EcMut mostró una menor estabilidad térmica bajo condiciones similares. A 50°C durante un minuto y dos minutos con treinta segundos, se observa una banda abundante de la proteína de interés, sin embargo, al aumentar el tiempo de exposición a cinco minutos, la cantidad de proteína disminuye drásticamente. A los 60°C, la proteína solo se conserva sin agregación durante un minuto, mientras que a 70°C se observa una pérdida progresiva de solubilidad, siendo evidente a los 5 minutos de incubación, donde la banda correspondiente deja de ser predominante en el gel. Finalmente, al calentar la proteína durante un minuto a 80°C y 90°C, la banda de la proteína de interés deja de ser la banda principal, y a los cinco minutos de exposición al calor se puede apreciar cómo se elimina la mayoría de los contaminantes proteicos. Aunque el tratamiento térmico reduce la presencia de contaminantes, también conlleva una pérdida considerable de la proteína de interés (Figura 19).

Estos resultados indican que la variante mutada de *E. coli* es significativamente menos estable térmicamente en comparación con la Pol III de *A. aeolicus*, lo que limita su uso en estrategias de purificación basadas en calor.

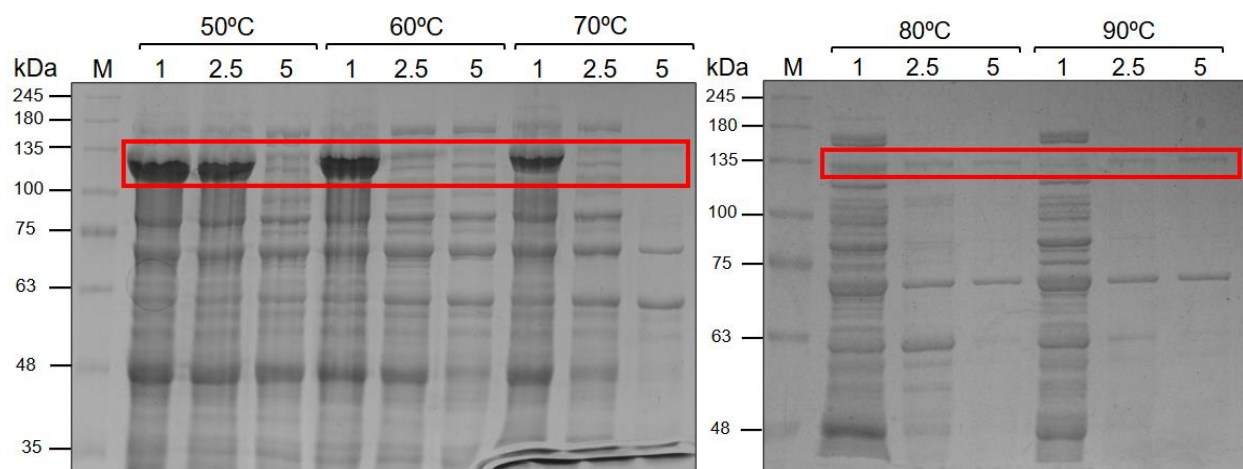


Figura 19. Análisis por SDS-PAGE del sobrenadante de la Pol-III-EcMut después del tratamiento térmico a 50°C, 60°C, 70°C, 80°C y 90°C durante 1, 2.5 y 5 minutos. M: marcador de peso molecular. El recuadro rojo indica la región donde se espera observar la proteína de interés.

9.4. Ambas polimerasas conservan una estructura secundaria predominantemente α -helicoidal consistente con los modelos de AlphaFold

Para evaluar la estructura secundaria y el estado de plegamiento de las polimerasas se utilizó espectroscopía de dicroísmo circular (DC). Los espectros obtenidos (Figura 20) muestran dos mínimos característicos para cada proteína alrededor de 208 y 222 nm, al igual que un máximo positivo alrededor de 190 nm, lo que indica un predominio de estructura α -helicoidal, que es compatible con los modelos de AlphaFold (Figura 3). Las señales de ambas proteínas son muy similares, lo que sugiere que conservan una arquitectura secundaria comparable. No obstante, se observan ligeras diferencias en la intensidad de las señales: la Pol-III-A tiene una señal mayor alrededor de 190 nm mientras que la Pol-III-EcMut tiene una señal un poco más negativa alrededor de 210-220 nm, esto probablemente por el acomodo tridimensional de las estructuras secundarias.

Adicionalmente, se realizó la deconvolución de los espectros de DC utilizando el servidor BeStSel, lo que permitió estimar el contenido de estructura secundaria de ambas proteínas. Los resultados obtenidos muestran una buena concordancia con las predicciones estructurales de AlphaFold, confirmando el predominio de contenido α -helicoidal y apoyando la validez de los modelos estructurales empleados (Tabla 10). En

conjunto, estos resultados indican que ambas proteínas se encuentran correctamente plegadas y presentan un contenido de estructura secundaria similar.

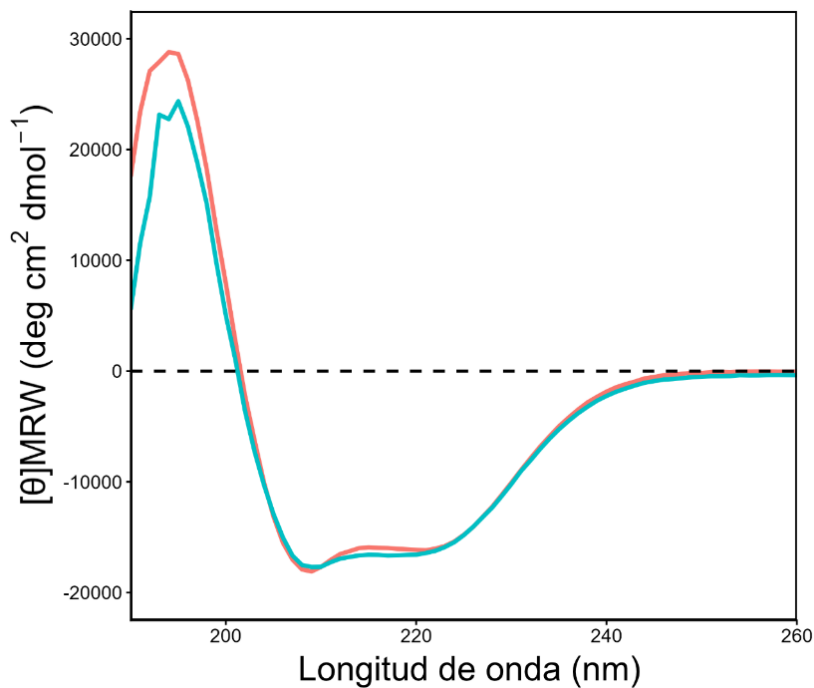


Figura 20. Espectros de dicroísmo circular de ambas polimerasas en un rango de 190 a 260 nm. La Pol-III-Aa se muestra en rojo y en azul la Pol-III-EcMut.

Tabla 10. Datos comparativos del contenido de estructura secundaria obtenido mediante la deconvolución de los datos experimentales de DC y porcentajes calculados con el modelo de AlphaFold utilizando el programa BeStSel.

Tipo de estructura secundaria	Pol-III-EcMut		Pol-III-Aa	
	DC deconvolución	AlphaFold	DC deconvolución	AlphaFold
Hélices α	49	51.8	58.5	52.5
Láminas β	10	12.9	5	13.3
Estructuras desordenadas	41	35.3	36.5	34.2

9.5. Ambas polimerasas presentan espectros de fluorescencia característicos de proteínas correctamente plegadas

Para evaluar la estructura terciaria de las proteínas de interés, se realizó un análisis por espectroscopia de fluorescencia intrínseca. Los espectros obtenidos (Figura 21) muestran que ambas polimerasas presentan un máximo de emisión alrededor de 330 nm, lo que es característico de residuos de triptófano en un entorno relativamente hidrofóbico. Aunque se observan ligeras diferencias en la forma e intensidad de las señales, la posición del máximo de emisión es similar en ambas proteínas, lo que sugiere que los residuos aromáticos se encuentran en un entorno estructural comparable.

Estos resultados son consistentes con proteínas correctamente plegadas que conservan su estructura terciaria.

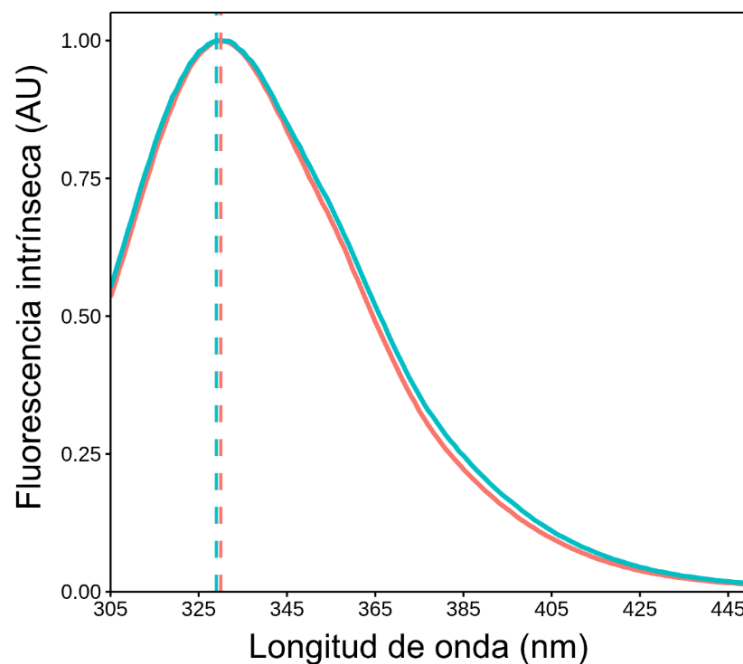


Figura 21. Espectros de fluorescencia intrínseca de ambas polimerasas. En rojo se muestra la Pol-III-Aa con λ_{max} : 330 nm y en azul la Pol-III-EcMut con λ_{max} : 329 nm.

9.6. La Pol-III-Aa presenta mayor estabilidad térmica que la variante Pol-III-EcMut

Con el fin de evaluar la estabilidad térmica y el proceso de desnaturalización de las polimerasas, se realizaron experimentos de calorimetría diferencial de barrido (DSC). Para ambas proteínas se observaron transiciones cooperativas, confirmando el buen estado de plegamiento de las polimerasas. El análisis de la Pol-III-EcMut (Figura 22A) mostró dos transiciones térmicas principales con temperaturas medias de desnaturalización de 43.3°C y 56.2°C, lo que sugiere un desplegamiento en al menos dos etapas, posiblemente asociado a diferentes dominios estructurales. En el caso de la Pol-III-Aa también se muestran dos transiciones térmicas, pero a temperaturas significativamente más altas, con valores de temperatura media de 60.4°C y 86.5°C (Figura 22B). Estas diferencias indican que la Pol-III-Aa presenta una mayor estabilidad térmica en comparación con la variante de *E. coli*, lo cual es consistente con su origen de un organismo hipertermófilo.

A partir de los datos de DSC, también se obtuvieron los cambios de entalpía (ΔH) asociados a cada transición (Tabla 11). La entalpía representa la energía absorbida durante un proceso y está relacionada con el número de interacciones estabilizantes que se rompen durante el proceso de desplegamiento. Al tener un mayor ΔH , mayor es la estabilidad estructural y la energía requerida para desnaturalizar la proteína es mayor también.

A partir de los datos, se obtuvieron dos ΔH por proteína correspondientes a las dos T_m observadas. La Pol-III-EcMut presenta un valor total de ΔH de 205.26 kcal mol⁻¹, con contribuciones importantes en ambas transiciones y ambos ΔH altos, lo que indica que esta proteína es altamente termoestable. En contraste, la Pol III de *A. aeolicus* presenta un ΔH_1 de apenas 5.6 kcal mol⁻¹, indicando que la mayor contribución energética al proceso de desplegamiento ocurre en la segunda transición, exactamente donde se obtiene ΔH_2 .

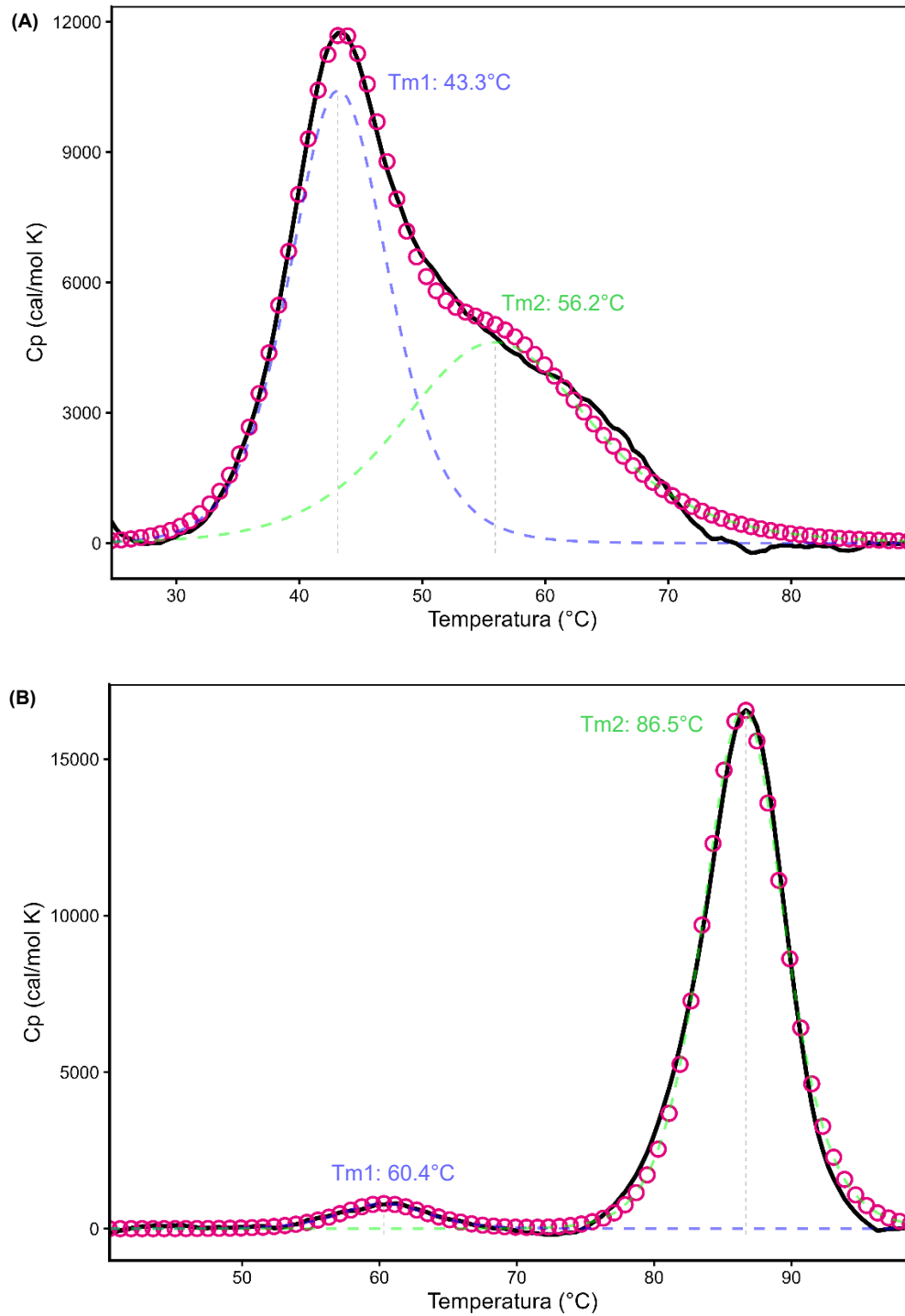


Figura 22. Despliegamiento térmico de ambas proteínas mediante calorimetría diferencial de barrido. **(A)** Pol-III-EcMut. Los datos experimentales se muestran como una línea negra, el ajuste global como círculos rosas vacíos, la línea punteada azul es la transición de la T_{m1} 43.3°C y la línea punteada verde es la segunda transición con una T_{m2} 56.2°C . **(B)** Pol-III-Aa. Los datos experimentales se muestran como una

línea negra, el ajuste global como círculos rosas vacíos, la línea punteada azul es la transición de la T_{m1} 60.4°C y la línea punteada verde es la segunda transición con una T_{m2} 86.5°C.

En conjunto, estos resultados sugieren que, aunque ambas proteínas presentan procesos de desnaturalización en múltiples etapas, la Pol-III-Aa requiere temperaturas más elevadas para desnaturalizarse, lo que refleja una mayor estabilidad térmica global.

Tabla 11. Valores termodinámicos (cambio de entalpía (ΔH) por transición y la suma total), obtenidos del desplegamiento térmico seguido por calorimetría diferencial de barrido.

Pol III	ΔH_1 (kcal mol⁻¹)	ΔH_2 (kcal mol⁻¹)	ΔH total (kcal mol⁻¹)
<i>E. coli</i>	120.0	85.2	205.2
<i>A. aeolicus</i>	5.5	130.9	136.5

9.7. Las Pol III muestran actividad catalítica limitada bajo las condiciones evaluadas

Para evaluar la actividad catalítica se realizaron ensayos de qPCR bajo distintas condiciones (Tabla 12). En el caso de la Pol-III-EcMut se muestra que la curva del control positivo comienza en cero y ascendiendo gradualmente después del décimo ciclo, mientras que ambos controles negativos permanecen sin señal, como se espera. En contraste, las condiciones evaluadas para la proteína comienzan con una fluorescencia más elevada, entre 0 y 0.2, que sugiere la presencia de señal basal o fluorescencia. En algunos pozos (7 y 8), se observa un incremento de la señal basal, sin embargo, estas curvas no presentan la forma sigmoidal típica de una amplificación eficiente. En los pozos restantes, la señal de fluorescencia comienza a descender después del décimo ciclo, lo que indica una posible agregación de la proteína y por eso una reducción de la señal de fluorescencia (Figura 23A).

Para la Pol-III-Aa, las muestras presentan valores iniciales de fluorescencia, en un rango de 0 y 0.25. Algunas condiciones (pozos 4,5,7,8 y 10) muestran incrementos de la señal de fluorescencia. La señal del pozo 4 es la segunda señal de fluorescencia más alta en las curvas, mientras que el pozo 9 representa la señal más alta de todas, sin embargo, la curva tiene una tendencia más lineal. El pozo 7,8 y 10 también forman una curva ascendente, mientras las otras muestras ascienden un poco después del quinto

ciclo y comienzan su descenso antes del décimo ciclo. Para las condiciones donde se observó aumento de la fluorescencia, no obstante, las curvas obtenidas presentan tendencias lineales o no sigmoides, lo que sugiere que no corresponden a una amplificación específica y eficiente (Figura 23B).

En conjunto, estos resultados indican que, bajo las condiciones evaluadas, no se observa una actividad catalítica robusta y reproducible para ninguna de las polimerasas. Sin embargo, la presencia de señales variables sugiere la posible existencia de actividad residual o condiciones parcialmente favorables, lo que indica la necesidad de optimizar los ensayos para evaluar de manera más concluyente la actividad enzimática.

Tabla 12. Condiciones experimentales utilizadas en los ensayos de qPCR para ambas polimerasas. CP: control positivo, CN: control negativo. Las mismas condiciones se utilizaron en ambas polimerasas.

Pozo	Condiciones	Pozo	Condiciones
1 (CP)	KAPA SYBR FAST DNA Polimerasa 5 ng ADN	7	2 mM MgCl ₂ 0.5 µL polimerasa 5 ng ADN
2 (CN)	1 mM MgCl ₂ 1 µL polimerasa No ADN	8	2 mM MgCl ₂ 1 µL polimerasa 5 ng ADN
3 (CN)	1 mM MgCl ₂ No polimerasa 5 ng ADN	9	2 mM MgCl ₂ 1.5 µL polimerasa 5 ng ADN
4	1 mM MgCl ₂ 1 µL polimerasa 5 ng ADN	10	2 mM MgCl ₂ 2 µL polimerasa 5 ng ADN
5	2 mM MgCl ₂ 1 µL polimerasa 5 ng ADN	11	2 mM MgCl ₂ 1 µL polimerasa 10 ng ADN
6	4 mM MgCl ₂ 1 µL polimerasa 5 ng ADN		

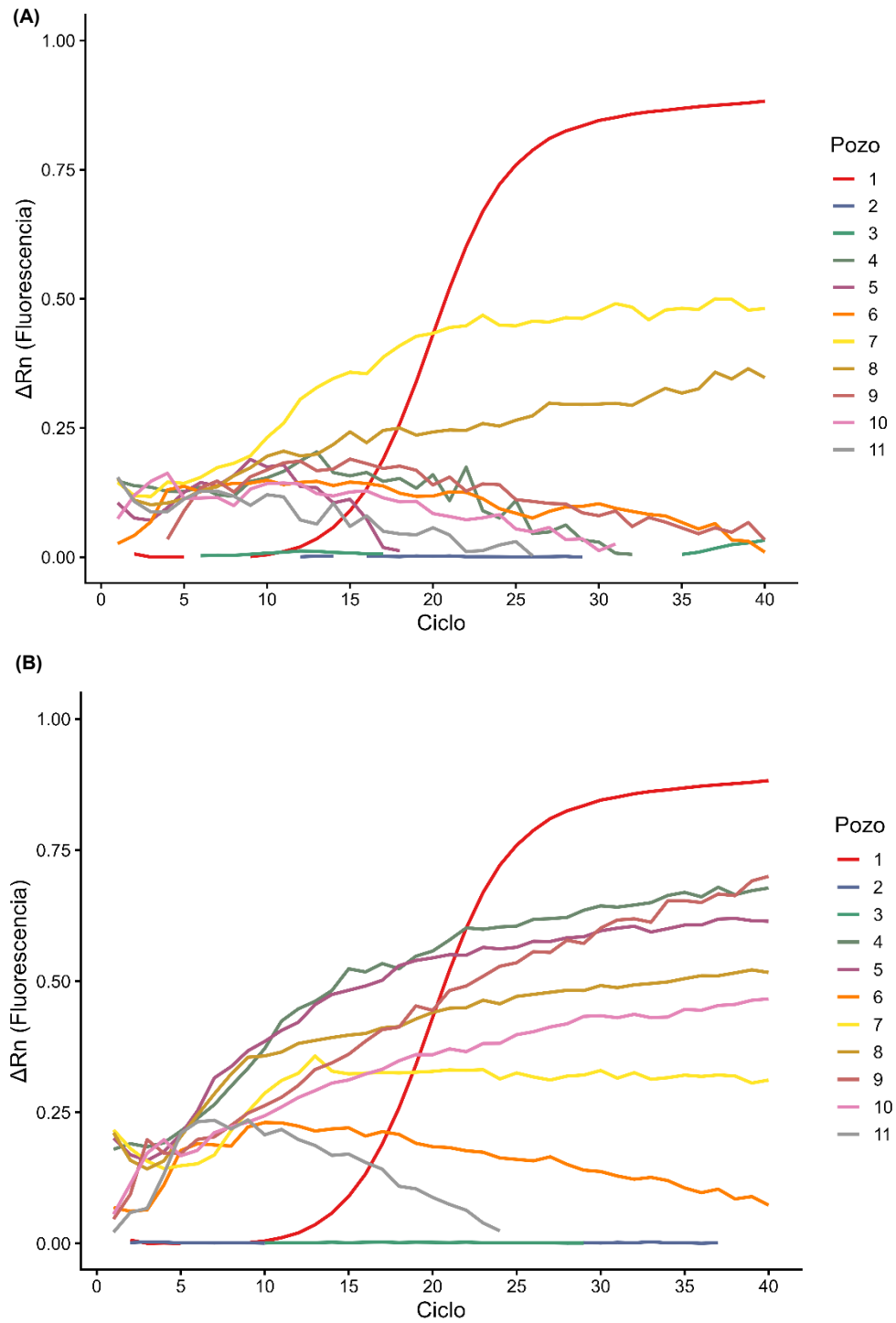


Figura 23. Curvas de amplificación de las polimerasas obtenidas por qPCR bajo distintas condiciones en cada pozo. **(A)** Curvas de amplificación de Pol-III-EcMut. **(B)** Curvas de amplificación de Pol-III-Aa.

10. DISCUSIÓN

La subunidad α de la Pol III desempeña un papel central en la replicación del ADN al ser la encargada de la actividad catalítica de polimerización, por lo que su estudio resulta clave para comprender el funcionamiento del sistema replicativo y estudiar la relación entre secuencia, estructura y función de este sistema proteico. Este trabajo se enfocó en el análisis comparativo de la subunidad α de la ADN polimerasa III de *Aquifex aeolicus* y de una variante mutante de *Escherichia coli*, con el propósito de evaluar sus propiedades bioquímicas, estructurales y funcionales.

Los ensayos de expresión mostraron diferencias importantes entre ambas proteínas. En el caso de la Pol-III-Aa fue suficiente evaluar distintas cepas, mientras que para la Pol-III-EcMut se tuvieron que optimizar más condiciones para obtener niveles de expresión y solubilidad adecuados.

Al expresar la Pol III de *E. coli* N71Q a altas temperaturas (37°C) y altas concentraciones de IPTG (3 mM), la proteína de interés se localizó principalmente en la fracción insoluble (pellet), lo que sugiere la formación de cuerpos de inclusión que no se disuelven en el citoplasma después de la lisis celular y por lo tanto se quedan en el pellet debido a esta insolubilidad. (Figura 6). Como se menciona en el trabajo publicado por Francis & Page sobre estrategias para expresión de proteína en *E. coli*, esto puede explicarse porque a altas temperaturas, la síntesis proteica en *E. coli* se sintetiza a una mayor velocidad, lo que a la vez favorece que no haya un plegamiento adecuado de las proteínas, propiciando la formación de agregados insolubles. Lo mismo ocurre al elevar la concentración del inductor: las altas concentraciones de IPTG producen un nivel muy alto de síntesis de la proteína deseada, saturando la maquinaria de plegamiento celular y favoreciendo la insolubilidad de las proteínas (Francis & Page, 2010).

Al disminuir la temperatura y la concentración de IPTG, a 25°C y 2 mM, respectivamente, se logró mejorar la solubilidad de la proteína. Al realizar la expresión con dos tiempos de incubación distintos se obtuvo que al expresar la Pol-III-EcMut durante 4 horas es posible conseguir una mayor cantidad de proteína soluble deseada que al expresarla durante 20 horas (Figura 7), ya que al extenderse mucho el tiempo de

inducción a dichas temperaturas las células comienzan a estresarse, propiciando un estrés oxidativo y la acumulación de proteína mal plegada (Jozefczuk et al., 2010; Schumann & Ferreira, 2004). Este comportamiento es consistente con la expresión de proteínas grandes o complejas, donde la velocidad de traducción y el plegamiento co-traducciona l juegan un papel crítico en la solubilidad final de la proteína.

En este contexto, la cepa BL21 Star (DE3) permitió una mayor expresión de la Pol-III-Aa (Figura 8), esto puede deberse a la estabilización del ARNm derivada de la mutación en la enzima RNasa E que contiene esta cepa, lo que incrementa la vida media del ARNm y favorece una traducción sostenida. En contraste, BL21(DE3) carece de esta modificación y la expresión de la proteína no fue eficiente. Por otro lado, la cepa Rosetta (DE3) prioriza el suministro de tRNAs para codones raros, lo cual no representó una ventaja significativa en la expresión de la proteína de interés (Morris et al., 2023), probablemente porque la secuencia de ADN ya estaba optimizada en el uso de codones para *E. coli*.

La purificación de la Pol III de *E. coli* fue relativamente más directa y sencilla que la de *A. aeolicus*, debido a que la secuencia de Pol-III-EcMut contaba con etiqueta de histidinas, lo que permitió que el primer paso de purificación fuera mediante una cromatografía de afinidad. La cromatografía de afinidad con etiquetas de histidina se basa en la capacidad de la His-tag para unirse específicamente a iones metálicos, en este caso Ni^{2+} , que se encuentran inmovilizados en una resina. Al pasar el extracto celular por la columna, la proteína que contiene la etiqueta de histidina se une al metal, eliminando múltiples contaminantes proteicos que no se unen a la columna. Finalmente, la proteína de interés se recupera mediante la adición de imidazol en una mayor concentración al buffer de elución, el cual compite con las histidinas por los sitios de unión al metal y provoca la elución de la proteína de interés (Bornhorst & Falke, 2000). Este primer paso sirvió para eliminar la mayor parte de contaminantes de la polimerasa, aunque parte de nuestra proteína quedó en el flujo inicial (Figura 9). La presencia de proteína en el flujo inicial sugiere que no toda la proteína recombinante se encontraba accesible o correctamente plegada para interactuar con la resina, lo cual es común en proteína parcialmente agregadas o mal plegadas. Posteriormente mediante la

cromatografía por exclusión de tamaño se obtuvieron fracciones muy puras, eliminando contaminantes proteicos de menor y mayor tamaño (Figura 10), por lo que esta estrategia experimental de purificación finalmente fue exitosa para obtener fracciones de proteína aptas para los siguientes pasos experimentales.

En el caso de la purificación de la Pol-III-Aa la ausencia de etiqueta requirió iniciar la purificación mediante precipitación con sulfato de amonio (Figura 12). Esta técnica se basa en una alteración de la solubilidad de las proteínas al aumentar la concentración de sulfato de amonio, lo que provoca que las proteínas pierden solubilidad y precipiten de manera controlada. Mediante este principio es posible separar grupos de proteínas según sus diferentes solubilidades, convirtiéndose en una buena opción como primer paso de purificación ya que conserva la estructura de la proteína y no se requiere de equipos sofisticados (Biotech beacons). Los pasos posteriores de cromatografía de intercambio aniónico y cromatografía de exclusión por tamaño permitieron tener una proteína bastante pura al final del proceso (Figura 13 y Figura 14). Adicionalmente, el tratamiento térmico resultó ser una estrategia efectiva de purificación, ya que permitió eliminar proteínas menos estables mientras la proteína de interés permanecía soluble (Figura 15). Este comportamiento es consistente con la naturaleza termoestable de proteínas provenientes de organismos hipertermófilos y representa una ventaja práctica en su purificación. Este enfoque resalta una ventaja importante de proteínas termoestables, ya que su estabilidad intrínseca puede ser explotada como estrategia de purificación selectiva.

Aquifex aeolicus es un organismo hipertermófilo, por lo que sus proteínas son bastante termoestables y al calentar el extracto de proteínas a temperaturas elevadas, la mayoría de las proteínas no termoestables, como las endógenas de *E. coli* se desnaturalizan y precipitan, mientras las termoestables como nuestra proteína de interés, se mantiene soluble y se recupera del sobrenadante después de centrifugar la muestra (Figura 15). Chang y colaboradores (Chang et al., 2001) realizaron un procedimiento de tratamiento térmico similar, pero con toda la ADN polimerasa de *A. aeolicus* a una temperatura de 80°C por 30 min, encontrando resultados similares a los obtenidos en el presente trabajo.

En cuanto a la caracterización estructural, los espectros de dicroísmo circular mostraron mínimos característicos a 208 y 222 nm (Figura 20), lo que indica un plegamiento predominante α helicoidal en ambas proteínas, el predominio de estas señales concuerda con la estructura secundaria descrita por (Lamers et al., 2006) para la subunidad α de esta polimerasa. Aunque la Pol-III-Aa tiene una señal negativa ligeramente más marcada, sugiriendo un mayor orden estructural en comparación con la Pol-III-EcMut. La similitud en el perfil espectral de ambas proteínas indica que la mutación no altera drásticamente el plegamiento global de esta polimerasa. La concordancia entre los resultados experimentales de dicroísmo circular y las predicciones estructurales obtenidas mediante AlphaFold (Tabla 10) refuerza la confiabilidad de los modelos *in silico* para describir la arquitectura secundaria de estas proteínas. Esta coincidencia sugiere que, a pesar de posibles diferencias en estabilidad o dinámica, la organización estructural global se mantiene conservada. Además, estos resultados obtenidos de dicroísmo circular son consistentes con los datos térmicos obtenidos por DSC, sugiriendo que una mayor organización secundaria contribuye a la estabilidad global de la proteína (Figura 22, Tabla 11).

De manera consistente, los espectros de fluorescencia intrínseca mostraron máximos de emisión que se encuentran entre 329 y 330 nm (Figura 21). La fluorescencia intrínseca al originarse de la presencia de residuos aromáticos, particularmente el triptófano, y cuya emisión puede observarse entre 330 y 350 nm, puede ser un indicativo del estado de plegamiento de las proteínas. Máximos de emisión cercanos a 330 nm, como es el caso de ambas proteínas de este trabajo, indican que los residuos de triptófano se encuentran en un ambiente hidrofóbico en el núcleo de la proteínas, sugiriendo que ambas polimerasas mantienen una estructura terciaria compacta y están correctamente plegadas (Ghisaidoobe & Chung, 2014). Aunque existe una ligera diferencia en el máximo de emisión entre ambas polimerasas, esto podría deberse a cambios en el microambiente de los triptófanos o cambios ligeros en la estructura terciaria provocados por la mutación, sin embargo, ambos espectros conservan una similitud general que sugiere que la arquitectura global de la proteína se conserva. Estos resultados son consistentes con los datos de dicroísmo circular, que evidencian la conservación de la estructura secundaria en ambas proteínas. Además, la conservación

casi idéntica del máximo de emisión en la región característica de triptófanos respalda la idea de que la mutación introducida no compromete la integridad estructural de la polimerasa de *E. coli*.

A pesar de esta similitud estructural, los resultados de DSC evidenciaron diferencias significativas en estabilidad térmica. La calorimetría diferencial de barrido (DSC) evalúa la estabilidad térmica de proteínas mediante la medición del cambio en la capacidad calorífica asociado con su desnaturalización térmica. Dentro de los parámetros más significativos que se obtiene de esta técnica, se encuentra la temperatura de transición térmica (T_m), que es el punto en el que aproximadamente la mitad de las moléculas se desnaturalizan (Gill et al., s/f). En este contexto, la Pol-III-EcMut mostró dos transiciones térmicas con valores de T_{m1} : 43.3°C y T_{m2} : 56.2°C (Figura 22Figura 22A), lo que sugiere un proceso de desnaturalización en dos etapas, posiblemente asociado al desplegamiento secuencial de diferentes dominios estructurales. Además, la presencia de dos transiciones térmicas en ambas proteínas sugiere un proceso de desnaturalización parcialmente cooperativo, posiblemente asociado a dominios estructurales con distinta estabilidad. Este comportamiento ha sido descrito en proteínas multidominio, donde regiones estructurales independientes pueden desplegarse de manera secuencial.

En contraste, la Pol-III-Aa presentó una transición principal significativamente más alta con T_{m1} : de 60.4°C y T_{m2} : 86.5°C (Figura 22B), indicando una mayor estabilidad térmica global, lo que es consistente con el origen termófilo de *A. aeolicus*, ya que las proteínas provenientes de organismos que habitan ambientes de altas temperaturas suelen presentar adaptaciones estructurales que incrementan su estabilidad térmica. Estos hallazgos son consistentes con la hipótesis planteada, en la cual se proponía que la Pol III de *A. aeolicus* presentaría mayor estabilidad térmica en comparación con la de *E. coli*, manteniendo al mismo tiempo un plegamiento estructural conservado. Además, esto coincide con lo reportado por Bruck y colaboradores (Bruck et al., 2002) donde constatan que la subunidad α de la Pol-III-Aa es la más termoestable de todas las subunidades, soportando temperaturas de hasta 90°C sin desnaturalizarse ni perder actividad.

La presencia de múltiples transiciones sugiere un proceso de desnaturalización en etapas, posiblemente asociado a diferentes dominios estructurales con distinta estabilidad. En este contexto, los valores de ΔH obtenidos reflejan la energía asociada a estos procesos, mientras que la estabilidad térmica global se relaciona principalmente con los valores de T_m .

Las diferencias observadas entre ambas polimerasas reflejan adaptaciones evolutivas a sus respectivos ambientes. Las proteínas de organismos termófilos suelen presentar un mayor número de interacciones estabilizadoras, como puentes salinos, empaquetamiento hidrofóbico más eficiente y redes de enlaces más densas, lo que contribuye a su mayor estabilidad térmica. Así, a pesar de que ambas polimerasas muestran espectros de dicroísmo circular y fluorescencia intrínseca similares, indicando una conservación en su estructura secundaria y terciaria, los resultados de DSC evidencian diferencias significativas en su estabilidad térmica. Esto sugiere que pequeñas variaciones en la organización estructural o en las interacciones intramoleculares pueden tener un impacto considerable en la estabilidad global de la proteína, sin alterar de manera evidente su plegamiento general.

En los ensayos de actividad catalítica se obtuvieron resultados preliminares. Aunque no se observaron curvas sigmoideas típicas de amplificación, algunas condiciones mostraron incrementos en la señal de fluorescencia. Estos resultados sugieren que las condiciones evaluadas no fueron óptimas para detectar actividad catalítica robusta. En las pruebas de la Pol-III-Aa (Figura 23B), con respecto a la concentración de Mg^{2+} óptima, se observa que a 1 mM de Mg^{2+} se obtiene la señal de fluorescencia más alta; sin embargo, con 2 mM de Mg^{2+} la señal forma una curva ascendente y con 1 mM la señal aumenta linealmente. Al aumentar esta concentración a 4 mM de Mg^{2+} , se puede apreciar que la señal decrece. Estos resultados difieren de los obtenidos por (Chang et al., 2001) donde se reportan concentraciones óptimas de Mg^{2+} entre 4 y 5 mM.

Al utilizar un volumen de 1.5 μL (48.45 μg) de proteína se obtiene la señal más alta de fluorescencia. Es difícil determinar un volumen adecuado debido a que no se tiene cuantificada esta proteína por unidades, sin embargo, los ensayos fueron

estandarizados utilizando la concentración de la proteína en mg/mL. Así a futuro se podrían diseñar mejores condiciones experimentales para estudiar a estas polimerasas.

Por otra parte, en la Pol-III-EcMut las señales de fluorescencia en las muestras con distintas concentraciones de Mg^{2+} y distintos volúmenes de polimerasa variaron el comportamiento de la enzima. A una concentración estándar de 2 mM de Mg^{2+} , fueron las únicas que mostraron un aumento en la señal de fluorescencia; la muestra con 0.5 μ L (6.74 μ g) de proteína presentó la señal de fluorescencia más alta. Sin embargo, las demás muestras no presentan ningún tipo de aumento de fluorescencia. Este resultado negativo era algo que se esperaba debido a que *E. coli* no es un organismo termófilo como *A. aeolicus*, por lo tanto, esta polimerasa presenta una menor estabilidad térmica, lo que limita su capacidad de mantener una conformación estructural activa bajo las condiciones de qPCR.

En ambas proteínas al utilizar el doble de ADN, es decir 10 ng, la señal no asciende para nada. Esto podría deberse a que un exceso de ADN puede provocar inhibición de la polimerasa y por lo tanto de la reacción, lo que se puede ver relegado en problemas como una amplificación en ciclos muy tempranos, curvas anormales con fase exponencial muy corta, o incluso saturación del detector de fluorescencia (Bustin et al., 2009; Schrader et al., 2012).

Entre las limitaciones principales del presente estudio se encuentra la dificultad para establecer ensayos funcionales concluyentes, así como la evaluación de la actividad catalítica en ausencia del complejo holoenzimático completo. Estudios futuros podrían incluir la reconstitución del sistema completo o el uso de condiciones optimizadas específicas para cada polimerasa.

Es importante considerar que la subunidad α de la ADN polimerasa III forma parte de un complejo multiproteico, y su actividad catalítica óptima depende de la interacción con otras subunidades del replisoma, como la abrazadera β y el complejo cargador. Por lo tanto, la evaluación de la actividad enzimática de la subunidad aislada puede no reflejar completamente su capacidad catalítica en condiciones fisiológicas, lo que podría explicar la ausencia de curvas de amplificación típicas en los ensayos de qPCR. Además,

factores como la concentración de Mg^{2+} , la cantidad de ADN molde y errores de pipeteo pueden influir significativamente en los resultados obtenidos.

En conjunto, los resultados obtenidos muestran que, a pesar de que ambas polimerasas conservan una estructura secundaria y terciaria similar, presentan diferencias significativas en su estabilidad térmica y comportamiento funcional. La Pol-III-Aa exhibe una mayor estabilidad térmica, lo que se refleja tanto en los ensayos de DSC como en su capacidad de resistir tratamientos térmicos durante la purificación. En contraste, la variante de *E. coli*, aunque esta estructuralmente conservada, presenta una menor estabilidad térmica, lo que impacta su comportamiento en condiciones de estrés térmico y limita su actividad en ensayos como qPCR. Estos resultados resaltan la importancia de la estabilidad térmica como un factor clave en la funcionalidad de las polimerasas, particularmente en aplicaciones biotecnológicas que requieren condiciones extremas.

Así, este trabajo demuestra que la subunidad α de la ADN polimerasa III puede ser expresada, purificada y caracterizada mediante un enfoque biofísico integral, permitiendo establecer relaciones claras entre su estructura, estabilidad y función. Estos resultados proporcionan una base importante para futuros estudios de ingeniería de proteínas y optimización de polimerasas con aplicaciones biotecnológicas.

11. CONCLUSIONES

En este trabajo se analizó la subunidad α de la ADN Pol III de *Aquifex aeolicus* y una variante mutante de la subunidad α de la ADN Pol III *Escherichia coli* con el objetivo de caracterizar sus propiedades bioquímicas y establecer bases funcionales y estructurales que permitan el diseño de aplicaciones biotecnológicas futuras. Los resultados mostraron que ambas proteínas presentan diferencias en sus condiciones de expresión y purificación, siendo la polimerasa mutante de *E. coli* más propensa a formar cuerpos de inclusión bajo condiciones estándares de sobreexpresión, mientras que la enzima de *A. aeolicus* se expresó de manera más eficiente en una de las cepas ensayadas. De igual manera, las estrategias de purificación empleadas permitieron obtener proteínas con un

alto grado de pureza, destacando el uso de cromatografía de afinidad y exclusión por tamaño para la Pol-III-EcMut con etiqueta de histidinas y la combinación de precipitación con sulfato de amonio y cromatografías de varios tipos para la Pol-III-Aa.

Los análisis estructurales mediante dicroísmo circular y fluorescencia intrínseca indicaron que ambas polimerasas conservan un plegamiento global similar, con una estructura secundaria predominante de α -hélice y residuos de triptófano localizados en ambientes hidrofóbicos, lo que sugiere estructuras terciarias bien plegadas en ambas proteínas. Los resultados de dicroísmo circular, en concordancia con el análisis de deconvolución y los modelos de AlphaFold, confirman que ambas polimerasas conservan una estructura secundaria predominantemente α -helicoidal. Además, los experimentos de calorimetría diferencial de barrido revelaron transiciones cooperativas para ambas proteínas y una mayor estabilidad térmica en la Pol-III-Aa, consistente con su origen hipertermófilo. Finalmente, los ensayos de actividad catalítica permitieron obtener resultados preliminares que sugieren una dependencia de la actividad con la concentración de Mg^{2+} , con la cantidad de enzima y con la concentración de ADN molde utilizado, aunque será necesario optimizar las condiciones experimentales para obtener curvas cinéticas más definidas en el caso de la Pol-III-Aa, mientras que para la Pol-III-EcMut, podría ser necesario emplear metodologías alternativas en las que no se exponga a la proteína a altas temperaturas.

En conjunto, estos resultados demuestran que ambas polimerasas conservan su estructura global, presentan diferencias importantes en su estabilidad térmica y comportamiento funcional. Este trabajo contribuye a la caracterización comparativa de la subunidad bioquímica y biofísica de la subunidad α de la ADN polimerasa III y proporciona una base para futuros estudios enfocados en su optimización y aplicación en biotecnología. Asimismo, los hallazgos resaltan la estrecha relación entre la secuencia, la estructura y la función de las proteínas, evidenciando como variaciones en la secuencia pueden traducirse en cambio significativos en la estabilidad y el desempeño funcional, aun cuando el plegamiento global se mantiene conservado.

12. PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos en este trabajo abren diversas líneas de investigación que pueden contribuir al entendimiento y aprovechamiento biotecnológico de las ADN polimerasas replicativas bacterianas. En primer lugar, será fundamental optimizar los ensayos de actividad catalítica, evaluando condiciones experimentales más específicas para cada proteína, tales como variaciones en el buffer, concentraciones de cofactores como Mg^{2+} , temperaturas de reacción y el uso de sistemas alternativos de medición de actividad. Asimismo, sería relevante explorar ensayos funcionales distintos a la qPCR, que permitan evaluar de manera más directa la capacidad de polimerización de la subunidad α . Considerando que la subunidad α forma parte de un complejo multiproteico, una perspectiva importante es la reconstitución parcial o total de la holoenzima ADN polimerasa III, incorporando otras subunidades clave como la abrazadera β y el complejo cargador. Esto permitiría evaluar su actividad en un contexto más cercano al fisiológico y comprender mejor su comportamiento catalítico.

En el ámbito estructural, futuros estudios podrían incluir técnicas de mayor resolución, como cristalografía de rayos X, con el fin de obtener información detallada sobre la organización tridimensional de estas proteínas y su relación con la estabilidad térmica observada. Además, el análisis comparativo con modelos estructurales predichos podría ayudar a identificar determinantes moleculares específicos asociados. Desde el punto de vista de la ingeniería de proteínas, los resultados obtenidos sugieren que es posible explorar mutaciones adicionales en la subunidad α que permitan mejorar su estabilidad térmica sin comprometer su estructura global. En este sentido, estrategias de diseño racional o evolución dirigida podrían emplearse para generar variantes con propiedades optimizadas para aplicaciones específicas.

Finalmente, el estudio comparativo entre proteínas mesófilas y termófilas, como el realizado en este trabajo, representa una aproximación valiosa para identificar principios generales que gobiernan la estabilidad y función de proteínas. Estos conocimientos pueden ser aplicados en el desarrollo de enzimas más robustas, con potencial uso en biotecnología, diagnóstico molecular y biología sintética.

13. REFERENCIAS

- Akram, F., Shah, F. I., Ibrar, R., Fatima, T., Haq, I. U., Naseem, W., Gul, M. A., Tehreem, L., & Haider, G. (2023). Bacterial thermophilic DNA polymerases: A focus on prominent biotechnological applications. *Analytical Biochemistry*, 671, 115150. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2023.115150>
- Albà, M. (2001). Replicative DNA polymerases. *Genome Biology*, 2(1), REVIEWS3002. <https://doi.org/10.1186/gb-2001-2-1-reviews3002>
- Arezi, B., McKinney, N., Hansen, C., Cayouette, M., Fox, J., Chen, K., Lapira, J., Hamilton, S., & Hogrefe, H. (2014). Compartmentalized self-replication under fast PCR cycling conditions yields Taq DNA polymerase mutants with increased DNA-binding affinity and blood resistance. *Frontiers in Microbiology*, 5. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00408>
- Aschenbrenner, J., & Marx, A. (2017). DNA polymerases and biotechnological applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 48, 187–195. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.04.005>
- Baar, C., d'Abbadie, M., Vaisman, A., Arana, M. E., Hofreiter, M., Woodgate, R., Kunkel, T. A., & Holliger, P. (2011). Molecular breeding of polymerases for resistance to environmental inhibitors. *Nucleic Acids Research*, 39(8), e51–e51. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq1360>
- Betancurt-Anzola, L., O'Connell, K. C., Potapov, V., Ong, J. L., Tanner, N. A., Sauguet, L., & Zatopek, K. M. (2025). The A, B, C, D's of replicative DNA polymerase fidelity: Utilizing high-throughput single-molecule sequencing to understand the molecular

- basis for DNA polymerase accuracy. *Nucleic Acids Research*, 53(21), gkaf1143.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkaf1143>
- Bolje, A., & Gobec, S. (2021). Analytical Techniques for Structural Characterization of Proteins in Solid Pharmaceutical Forms: An Overview. *Pharmaceutics*, 13(4), 534.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13040534>
- Bornhorst, J. A., & Falke, J. J. (2000). [16] Purification of proteins using polyhistidine affinity tags. En *Methods in Enzymology* (Vol. 326, pp. 245–254). Elsevier.
[https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(00\)26058-8](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(00)26058-8)
- Bruck, I., Yuzhakov, A., Yurieva, O., Jeruzalmi, D., Skangalis, M., Kuriyan, J., & O'Donnell, M. (2002). Analysis of a Multicomponent Thermostable DNA Polymerase III Replicase from an Extreme Thermophile. *Journal of Biological Chemistry*, 277(19), 17334–17348. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110198200>
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J., & Wittwer, C. T. (2009). The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry*, 55(4), 611–622.
<https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>
- Chang, J. R., Choi, J. J., Kim, H.-K., & Kwon, S.-T. (2001). Purification and properties of *Aquifex aeolicus* DNA polymerase expressed in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters*, 201(1), 73–77. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2001.tb10735.x>

- Cline, J. (1996). PCR fidelity of pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases. *Nucleic Acids Research*, 24(18), 3546–3551. <https://doi.org/10.1093/nar/24.18.3546>
- Coulther, T. A., Stern, H. R., & Beuning, P. J. (2019). Engineering Polymerases for New Functions. *Trends in Biotechnology*, 37(10), 1091–1103. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2019.03.011>
- Deckert, G., Warren, P. V., Gaasterland, T., Young, W. G., Lenox, A. L., Graham, D. E., Overbeek, R., Snead, M. A., Keller, M., Aujay, M., Huber, R., Feldman, R. A., Short, J. M., Olsen, G. J., & Swanson, R. V. (1998). The complete genome of the hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus*. *Nature*, 392(6674), 353–358. <https://doi.org/10.1038/32831>
- Dohrmann, P. R., Correa, R., Frisch, R. L., Rosenberg, S. M., & McHenry, C. S. (2016). The DNA polymerase III holoenzyme contains γ and is not a trimeric polymerase. *Nucleic Acids Research*, 44(3), 1285–1297. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1510>
- Durowoju, I. B., Bhandal, K. S., Hu, J., Carpick, B., & Kirkitadze, M. (2017). Differential Scanning Calorimetry — A Method for Assessing the Thermal Stability and Conformation of Protein Antigen. *Journal of Visualized Experiments*, (121), 55262. <https://doi.org/10.3791/55262>
- Eveleigh, R. J. M., Meehan, C. J., Archibald, J. M., & Beiko, R. G. (2013). Being *Aquifex aeolicus*: Untangling a Hyperthermophile's Checkered Past. *Genome Biology and Evolution*, 5(12), 2478–2497. <https://doi.org/10.1093/gbe/evt195>

- Francis, D. M., & Page, R. (2010). Strategies to Optimize Protein Expression in *E. coli*. *Current Protocols in Protein Science*, 61(1).
<https://doi.org/10.1002/0471140864.ps0524s61>
- Gefter, M. L., Hirota, Y., Kornberg, T., Wechsler, J. A., & Barnoux, C. (1971). Analysis of DNA Polymerases II and III in Mutants of *Escherichia coli* Thermosensitive for DNA Synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 68(12), 3150–3153.
<https://doi.org/10.1073/pnas.68.12.3150>
- Ghisaidoobe, A., & Chung, S. (2014). Intrinsic Tryptophan Fluorescence in the Detection and Analysis of Proteins: A Focus on Förster Resonance Energy Transfer Techniques. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(12), 22518–22538.
<https://doi.org/10.3390/ijms151222518>
- Gill, P., Moghadam, T. T., & Ranjbar, B. (s/f). *Differential Scanning Calorimetry Techniques: Applications in Biology and Nanoscience*.
- Gloeckner, C., Sauter, K. B. M., & Marx, A. (2007). Evolving a Thermostable DNA Polymerase That Amplifies from Highly Damaged Templates. *Angewandte Chemie International Edition*, 46(17), 3115–3117.
<https://doi.org/10.1002/anie.200603987>
- Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J., & Williams, P. M. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Research*, 6(10), 986–994. <https://doi.org/10.1101/gr.6.10.986>
- Ishino, S., & Ishino, Y. (2014). DNA polymerases as useful reagents for biotechnology – the history of developmental research in the field. *Frontiers in Microbiology*, 5.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00465>

- Jozefczuk, S., Klie, S., Catchpole, G., Szymanski, J., Cuadros-Inostroza, A., Steinhäuser, D., Selbig, J., & Willmitzer, L. (2010). Metabolomic and transcriptomic stress response of *Escherichia coli*. *Molecular Systems Biology*, 6(1), 364. <https://doi.org/10.1038/msb.2010.18>
- J.S, L., S, J., & N.E, D. (2016). The E. coli DNA Replication Fork. En *The Enzymes* (Vol. 39, pp. 31–88). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.enz.2016.04.001>
- Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Žídek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohl, S. A. A., Ballard, A. J., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., ... Hassabis, D. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, 596(7873), 583–589. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>
- Kelman, Z., & O'Donnell, M. (1995). DNA POLYMERASE III HOLOENZYME: Structure and Function of a Chromosomal Replicating Machine. *Annual Review of Biochemistry*, 64(1), 171–200. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.64.070195.001131>
- Koch, J., Romero-Romero, S., & Höcker, B. (2024). Stepwise introduction of stabilizing mutations reveals nonlinear additive effects in *de novo* TIM barrels. *Protein Science*, 33(3), e4926. <https://doi.org/10.1002/pro.4926>
- Kuril, A. K. (2024). Differential Scanning Calorimetry: A Powerful and Versatile Tool for Analyzing Proteins and Peptides. *Journal of Pharmaceutical Research International*, 36(7), 179–187. <https://doi.org/10.9734/jpri/2024/v36i77549>

- Kuznetsova, A. A., Fedorova, O. S., & Kuznetsov, N. A. (2022). Structural and Molecular Kinetic Features of Activities of DNA Polymerases. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(12), 6373. <https://doi.org/10.3390/ijms23126373>
- Lamers, M. H., Georgescu, R. E., Lee, S.-G., O'Donnell, M., & Kuriyan, J. (2006). Crystal Structure of the Catalytic α Subunit of E. coli Replicative DNA Polymerase III. *Cell*, 126(5), 881–892. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.028>
- Laos, R., Thomson, J. M., & Benner, S. A. (2014). DNA polymerases engineered by directed evolution to incorporate non-standard nucleotides. *Frontiers in Microbiology*, 5. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00565>
- Maki, H., Horiuchi, T., & Kornberg, A. (1985). The polymerase subunit of DNA polymerase III of Escherichia coli. I. Amplification of the dnaE gene product and polymerase activity of the alpha subunit. *The Journal of Biological Chemistry*, 260(24), 12982–12986.
- Maki, S., & Kornberg, A. (1988). DNA polymerase III holoenzyme of Escherichia coli. III. Distinctive processive polymerases reconstituted from purified subunits. *The Journal of Biological Chemistry*, 263(14), 6561–6569.
- Marians, K. J., Hiasa, H., Kim, D. R., & McHenry, C. S. (1998). Role of the Core DNA Polymerase III Subunits at the Replication Fork. *Journal of Biological Chemistry*, 273(4), 2452–2457. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.4.2452>
- McHenry, C. S., & Crow, W. (1979). DNA polymerase III of Escherichia coli. Purification and identification of subunits. *Journal of Biological Chemistry*, 254(5), 1748–1753. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)37836-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)37836-5)
- MicroCal PEAQ-DSC User Guide*. (s/f).

- Micsonai, A., Wien, F., Murvai, N., Nyiri, M. P., Balatoni, B., Lee, Y.-H., Molnár, T., Goto, Y., Jamme, F., & Kardos, J. (2025). BeStSel: Analysis site for protein CD spectra—2025 update. *Nucleic Acids Research*, 53(W1), W73–W83. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaf378>
- Morris, M. A., Bataglioli, R. A., Mai, D. J., Yang, Y. J., Paloni, J. M., Mills, C. E., Schmitz, Z. D., Ding, E. A., Huske, A. C., & Olsen, B. D. (2023). Democratizing the rapid screening of protein expression for materials development. *Molecular Systems Design & Engineering*, 8(2), 227–239. <https://doi.org/10.1039/D2ME00150K>
- Neffati, J., Petrounia, I., Moreira, R. D., & Chakrabarti, R. (2021). *DNA amplification in mixed aqueous-organic media: Chemical analysis of leading polymerase chain reaction compositions*. *Biochemistry*. <https://doi.org/10.1101/2021.10.02.462877>
- Parasuram, R., Coulther, T. A., Hollander, J. M., Keston-Smith, E., Ondrechen, M. J., & Beuning, P. J. (2018). Prediction of Active Site and Distal Residues in *E. coli* DNA Polymerase III alpha Polymerase Activity. *Biochemistry*, 57(7), 1063–1072. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.7b01004>
- Raia, P., Delarue, M., & Sauguet, L. (2019). An updated structural classification of replicative DNA polymerases. *Biochemical Society Transactions*, 47(1), 239–249. <https://doi.org/10.1042/BST20180579>
- Rodger, A., Marrington, R., Roper, D., & Windsor, S. (2005). Circular Dichroism Spectroscopy for the Study of Protein-Ligand Interactions. En G. Ulrich Nienhaus (Ed.), *Protein-Ligand Interactions* (Vol. 305, pp. 343–363). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-912-5:343>

- Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L., & Johne, R. (2012). PCR inhibitors—Occurrence, properties and removal. *Journal of Applied Microbiology*, 113(5), 1014–1026. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x>
- Schumann, W., & Ferreira, L. C. S. (2004). Production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Genetics and Molecular Biology*, 27(3), 442–453. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572004000300022>
- Scopes, R. K. (1988). *Protein purification: Principles and practice* (2. ed., 2. printing). Springer.
- Terpe, K. (2013). Overview of thermostable DNA polymerases for classical PCR applications: From molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(24), 10243–10254. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5290-2>
- Wang, G., Du, Y., Ma, X., Ye, F., Qin, Y., Wang, Y., Xiang, Y., Tao, R., & Chen, T. (2022). Thermophilic Nucleic Acid Polymerases and Their Application in Xenobiology. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(23), 14969. <https://doi.org/10.3390/ijms232314969>
- Zhao, X.-Q., Hu, J.-F., & Yu, J. (2006). Comparative Analysis of Eubacterial DNA Polymerase III Alpha Subunits. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 4(4), 203–211. [https://doi.org/10.1016/S1672-0229\(07\)60001-1](https://doi.org/10.1016/S1672-0229(07)60001-1)

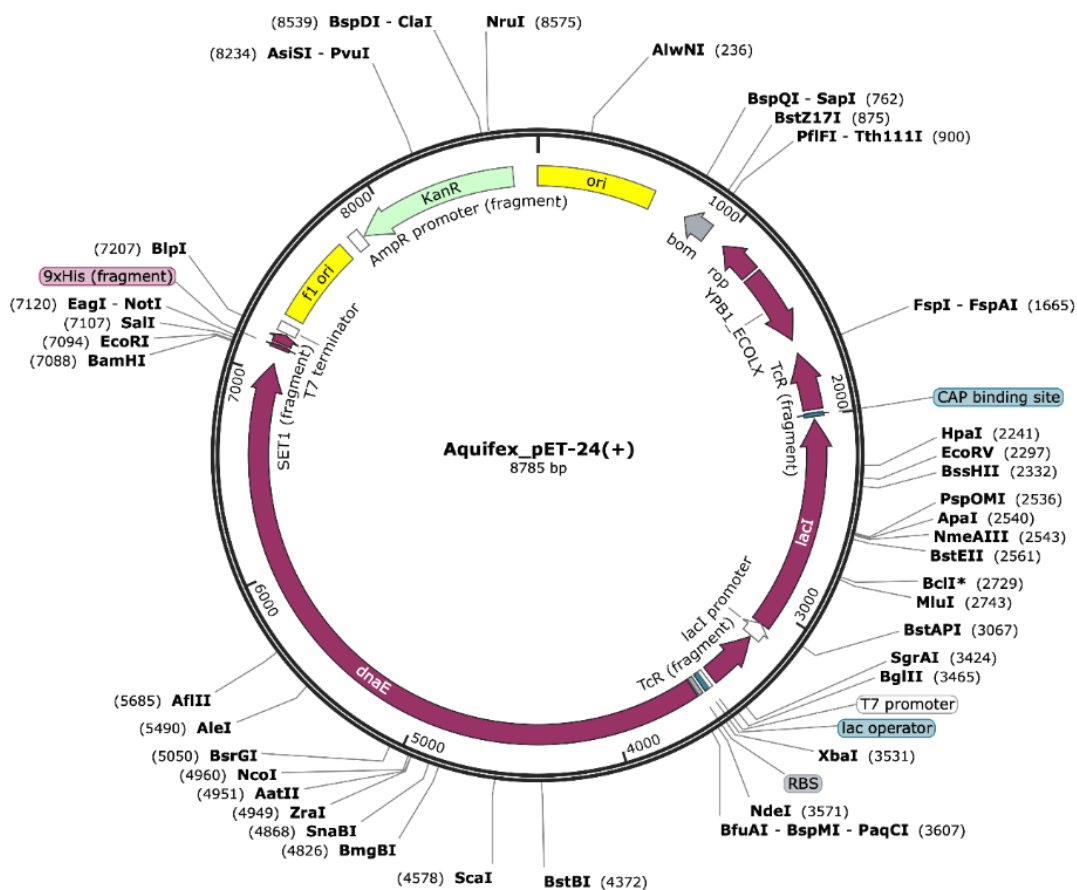


Figura 25. Mapa plasmídico del vector de expresión pET-24(+) que contiene el gen *dnaE* de la Pol-III-Aa.

14.2. Tablas complementarias

Tabla 13. Parámetros fisicoquímicos teóricos de ambas polimerasas.

Proteína	pl teórico	Peso molecular (Da)	Número de aminoácidos	ϵ_{280} ($\text{cm}^{-1} \text{mol}^{-1}$)
Pol-III-Aa	6.03	133207.70	1161	134680
Pol-III-EcMut	5.16	129978.71	1160	102860

Tabla 14. Fraccionamiento con sulfato de amonio que indica la masa requerida por litro de solución a 20°C. Adaptada de (Scopes, 1988).

% saturación inicial	Porcentaje final de saturación a ser obtenida																
	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
	Cantidad de sulfato de amonio a añadir (gramos) por litro de solución a 20°C																
0	113	114	176	208	242	277	314	351	390	430	472	516	561	608	657	708	761
5	85	115	146	179	212	246	282	319	357	397	439	481	526	572	621	671	713
10	57	86	117	149	182	216	251	287	325	364	405	447	491	537	584	634	685
15	28	58	88	119	151	185	219	255	292	331	371	413	456	501	548	596	647
20	0	29	59	89	121	154	188	223	260	298	337	378	421	465	511	559	609
25		0	29	60	91	123	157	191	227	265	304	344	386	429	475	522	571
30			0	30	61	92	126	160	195	232	270	309	351	393	438	485	533
35				0	30	62	94	128	163	199	236	275	316	358	402	447	495
40					0	31	63	96	130	166	202	241	281	322	365	410	457
45						0	31	64	97	132	169	206	245	286	329	373	419
50							0	32	65	99	135	172	210	250	292	335	381
55								0	33	66	101	138	175	215	256	298	343
60									0	33	67	103	140	179	219	261	305
65										0	34	69	105	143	183	224	266
70											0	34	70	107	146	186	228
75												0	35	72	110	149	190
80													0	36	73	112	152
85														0	37	75	114
90															0	37	76
95																0	38