



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA**

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA CELULAR Y BIOCATALISIS

**¿Es la proteólisis de la dextranasa (DsrS) de
Leuconostoc mesenteroides B512F un proceso autocatalítico?**

T E S I S

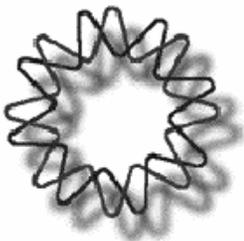
Que para obtener el grado académico de MAESTRA EN CIENCIAS

Presenta

LAQB Erika Mellado Mojica

DIRECTORA DE TESIS:

Dra. Clarita Olvera Carranza



CUERNAVACA, MORELOS. 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

En memoria Sr. Heriberto Mellado López[†] (29/05/1952-21/07/2008)

No me molesta regalárselo al cielo, sino quitárselo al futuro...

Puesto que a mi me ha dado lo mejor de todo.

Te amé, te amo y te amaré siempre... tu pequeña niña

Erika

Jurado asignado

Dr. Cevallos Gaos Miguel Ángel Carlos

Dra. Espin Ocampo Elda Guadalupe

Dra. Gómez Gómez Isabel

Dra. Olvera Carranza Clarita

Dra. Quirasco Baruch Maricarmen

Este trabajo se realizó en el Departamento de Ingeniería celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la tutoría de la Dra. Clarita Olvera Carranza en el grupo de investigación del Dr. Agustín López-Munguía Canales

Cuernavaca, Morelos 2009

Los estudios de Maestría fueron posibles gracias al apoyo económico otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) a través de la beca No. 184853 y el proyecto de investigación No. 40609-Z. De igual forma al apoyo económico otorgado por Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) a través del proyecto PAPIIT No. IN228006-3

ABREVIATURAS EMPLEADAS EN EL TEXTO

2D	Doble dimensión
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
Anti-DsrS	Anticuerpos dirigidos contra la DsrS
Anti-His	Anticuerpos dirigidos contra una etiqueta de histidinas
Anti-Trx	Anticuerpos dirigidos contra tiorredoxina
ARNm	Ácido Ribonucleico Mensajero
Asr	Alternansacarasa
BSA	Albúmina bovina sérica
CGTasa	Ciclodextringlucanotransferasas
CONACYT	Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología
CW	Pared celular (Cell Wall, por sus siglas en inglés)
CWD	Dominio de unión a pared celular (Cell Wall Domain, por sus siglas en inglés)
DC	Dominio catalítico
DO	Densidad óptica
DsrA	Dextransacarasa A
DsrB	Dextransacarasa B
DsrC	Dextransacarasa C
DsrD	Dextransacarasa D
DsrE	Dextransacarasa E
DsrP	Dextransacarasa P
DsrS	Dextransacarasa S
DsrT5	Dextransacarasa T5
EIS3	Inulosacarasa 3
ELISA	Ensayo Inmunoabsorbente Acoplado a Enzimas
GH	Glicósido hidrolasa
GtfA	Glucosiltransferasa A
GtfB	Glucosiltransferasa B
GtfC	Glucosiltransferasa C
GtfD	Glucosiltransferasa D
GtfG	Glucosiltransferasa G
GtfI	Glucosiltransferasa I

GtfJ	Glucosiltransferasa J
GtfK	Glucosiltransferasa K
GtfL	Glucosiltransferasa L
GtfM	Glucosiltransferasa M
GtfS	Glucosiltransferasa S
GtfT	Glucosiltransferasa T
HPLC	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
HRP	Peroxidasa de rábano blanco
IBT	Instituto de Biotecnología
IgG	Inmunoglobulina G
kDa	Kilo Saltones
Ki	Constante de inhibición
Kpb	Kilo pares de bases nucleotídicas
LB	Luria-Bertani
LM	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
LytA	Autolisina A
°C	Grados centígrados
PAGE	Electroforesis de Proteínas en Geles de Poliacrilamida
pb	Pares de bases nucleotídicas
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
pH	Potencial de hidrógeno
SDS	Duodecil Sulfato de Sodio
TcdB	Toxina B de <i>C. difficile</i>
TDH	DsrS recombinante (TiorredoxinaDsrSHis)
TIM	Triosafosfato Isomerasa
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México

ÍNDICE

Contenido	Página
Índice de tablas	v
Índice de figuras	vi
Resumen	1
Introducción	3
I. Antecedentes	5
I.1 Dextrana y dextransacarasa	5
I.2 Mecanismo de reacción	8
I.2.1 Polimerización: elongación hacia el extremo no reductor	9
I.2.2 Reacciones de aceptor	10
I.3 Estructura de las dextransacarosas	12
I.3.1 Péptido señal	12
I.3.2 Región variable	13
I.3.3 Región catalítica	13
I.3.4 Región C-terminal	14
I.4 Estructura terciaria de las dextransacarosas	15
I.4.1 Dominio catalítico	15
I.4.2 Dominio C-terminal	16
I. 5 Sistema proteolítico en bacterias	17
I. 6 Autoproteólisis	20
I. 7 Proteólisis de la dextransacarasa (DsrS) de <i>L. mesenteroides</i> B512 F	22
II. Objetivos	28
II. 1 Objetivo general	28
II. 2 Objetivos específicos	28
III. Estrategia experimental	29
III. 1 Producción de anticuerpos Anti-DsrS	29
III. 2 Efecto del pH, temperatura, inhibidores de proteasas y almacenamiento en el fenómeno proteolítico de la dextransacarasa (DsrS) de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> B512F	30

III. 3 Caracterización del fenómeno proteolítico de la DsrS recombinante	30
III. 4 Efecto de los inhibidores de proteasas y del pH en el fenómeno proteolítico de la dextranacarasa (DsrS) recombinante	31
III. 5 Efecto del pH, temperatura, inhibidores de proteasas y almacenamiento en el fenómeno proteolítico de la dextranacarasa (DsrS) recombinante	32
III. 6 Naturaleza del fenómeno proteolítico. Caracterización proteolítica de la enzima recombinante libre de proteasas	32
III. 7 Naturaleza del fenómeno proteolítico de la DsrS. Análisis en SDS-PAGE 2D	33
III. 8 Papel de los dominios N y C-terminal en el procesamiento proteolítico de la DsrS	33
IV. Materiales y reactivos	34
IV.1. Cepas bacterianas	34
IV.2. Medios de Cultivo	34
IV.2.1 Medio cultivo de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> (LM)	34
IV.2.2 Medio Luria-Bertani (LB)	34
IV.2.3 Medio YT2X	35
IV.2.4 Medio Soc	35
IV.3 Soluciones	36
IV.3.1 Extracción de proteínas de cuerpos de inclusión en <i>E. coli</i>	36
IV.3.2 Técnica de Elisa	36
IV.3.3 Western Blot	37
IV.3.4 Purificación de proteínas por afinidad a columnas de Níquel	37
IV.3.5 Adsorción de anticuerpos contaminantes	38
IV.4 Técnicas de Biología Molecular	38
IV.4.1 Purificación del ADN cromosomal de <i>L. mesenteroides</i> B512F	38
IV.4.2 Purificación de plásmidos	38
IV.4.3 Oligonucleótidos	38
IV.4.4 Amplificaciones por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	39
IV.4.5 Secuenciación de los productos amplificados	40
IV.5 Hibridaciones	40
IV. 6 Clonación de los productos de amplificación	40
IV.7 Plásmidos y vectores utilizados en este trabajo	41
IV. 8. Construcción pThioBarrilHis	41

IV.9. Producción de la DsrS nativa, recombinante y dominio catalítico de la DsrS	42
IV.9.1 Producción de la Dextranasa de <i>L. mesenteroides</i> B512F	42
IV.9.2. Expresión de la proteína DsrS recombinante	43
IV.9.3. Expresión del dominio catalítico de la DsrS	43
IV.9.4 Electroforesis de proteínas	44
IV.9.5. Determinación de la actividad enzimática de la DsrS	45
IV.9.6. Cuantificación de proteínas	45
IV.9.7 Relación de la actividad Hidrólisis/Transferencia de la DsrS mediante HPLC	45
IV.10. Análisis de las secuencias	45
IV.11 Producción de anticuerpos policlonales Anti-DsrS	46
IV.11.1 Expresión de la proteína DsrS4 (Antígeno)	46
IV.11.2 Preparación y extracción de las proteínas insolubles DsrS4 (cuerpos de inclusión) de <i>E. coli</i>	46
IV.11.3 Cuantificación de la proteína DsrS4	47
IV.11.4 Inmunización a conejos	47
IV.11.5 Titulación de anticuerpos y EC ₅₀	47
IV.11.5.1 Técnica de ELISA	49
IV.12 Adsorción de anticuerpos contaminantes	50
IV.13 Ensayos de Western Blot	51
IV.14 Ensayos con inhibidores de proteasas	52
IV.15 Purificación de la DsrS recombinante por columna de afinidad a níquel	52
IV.16 Análisis de proteínas en geles de doble dimensión	53
IV.16.1 Cuantificación de la proteína	53
IV.16.2 Isoelectroenfoco	53
IV.16.3 Electroforesis de proteínas en segunda dimensión (2D)	53
IV.17 Purificación de las formas de 170 y 155 kDa (Fracción TDH1) mediante electroelusión	54
V. Resultados	55
V.1 Estudio del procesamiento proteolítico en la dextranasa (DsrS) de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> B512F	55
V. 2 Estudio del procesamiento proteolítico en la dextranasa (DsrS) recombinante	59

V.2.1 Caracterización del fenómeno proteolítico de la DsrS recombinante	59
V.2.2 Efecto de los inhibidores de proteasas en el proceso de producción y extracción de la enzima recombinante	61
V.2.3 Efecto de los inhibidores de proteasas, pH, temperatura y tiempo de almacenamiento en el procesamiento proteolítico de la dextransacarasa (DsrS) recombinante	62
V.3 Naturaleza del fenómeno proteolítico de la dextransacarasa	68
V.3.1 Caracterización proteolítica de la enzima recombinante libre de proteasas	68
V.3.2 Análisis de electroforesis de proteínas de doble dimensión (SDS-PAGE 2D)	70
V.4 Papel de los dominios N-terminal y C-terminal en el procesamiento autoproteolítico de la dextransacarasa (DsrS)	77
VI. Discusión	82
VII. Conclusiones	84
VIII. Perspectivas	86
IX. Referencias bibliográficas	87
Agradecimientos	

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Análisis comparativo del tamaño y la estructura del producto de las glucosiltransferasas de <i>Streptococcus spp.</i> , <i>Lactobacillus</i> y las de <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	7
Tabla 2. Unidades de repetición localizadas en la región C-terminal de la glucosiltransferasas	14
Tabla 3. Pesos moleculares reportados para la DsrS de <i>L. mesenteroides</i> B512F en diversas publicaciones	22
Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación del dominio catalítico de la DsrS y secuenciación de los productos clonados	38
Tabla 5. Vectores y plásmidos utilizados en este proyecto	41
Tabla 6. Anticuerpos utilizados en los ensayos de Western Blot	52
Tabla 7. Inhibidores de proteasas empleados en el proceso de fermentación y extracción de la DsrS recombinante: Complete y Pepstatina	61

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Representación de las estructuras de los glucanos sintetizados por diferentes glucosiltransferasas de <i>Streptococcus spp.</i> , <i>Lactobacillus</i> y <i>L. mesenteroides</i>	6
Figura 2. Reacciones catalizadas por la dextransacarasa (DsrS)	8
Figura 3. Mecanismo de polimerización de la dextransacarasa (DsrS)	9
Figura 4. Reacciones de aceptor de la dextransacarasa	10
Figura 5. Mecanismo para la formación de enlaces ramificados en la dextrana	11
Figura 6. Modelo estructural del sitio activo de la dextransacarasa propuesto por Tarriseven y Robyt (1992)	11
Figura 7. Esquema estructural de las dextransacarasas	12
Figura 8. Modelamiento de la estructura terciaria de la dextransacarasa DsrP	16
Figura 9. Estructura terciaria propuesta para el Dominio C-terminal de la dextransacarasa DsrP	17
Figura 10. Procesamiento proteolítico de la DsrS de <i>L. mesenteroides</i> B512F	23
Figura 11. Procesamiento proteolítico de la DsrS (FMC) de <i>L. mesenteroides</i> B512FMC	24
Figura 12. Sitio de escisión en la DsrS (FMC) identificados mediante secuenciación de la región N-terminal y localización de las secuencias aminoácidas YF	24
Figura 13. Fenómeno proteolítico de DsrS recombinante, analizado mediante zimogramas	25
Figura 14. Producción de la DsrS en <i>Bacillus megaterium</i>	25
Figura 15. Secuencia aminoácida de las 3 formas dominantes derivadas de la proteólisis de la DsrS recombinante	26
Figura 16. Sitios y secuencias de corte proteolítico identificados en la dextransacarasa (DsrS) de <i>L. mesenteroides</i> B512F nativa y recombinante	27
Figura 17. Análisis de la secuencia aminoácida de la DsrS e identificación del dominio catalítico conservado dentro de la familia 70 de las glicosilhidrolasas	42
Figura 18. Identificación de la clona que contiene el gen que expresa el dominio catalítico de la DsrS	42
Figura 19. Ubicación de la proteína DsrS4, empleada como inmunógeno en la producción de anticuerpos Anti-DsrS, en la proteína DsrS	46
Figura 20. Análisis de la proteína DsrS4 mediante SDS-PAGE de doble dimensión	47

Figura 21. Esquema de producción de anticuerpos Anti-DsrS.	48
Figura 22. Gráfica de dosis-respuesta, para definir el valor EC ₅₀ para el anticuerpo Anti-DsrS, usando como antígeno la DsrS4	48
Figura 23. Titulación de anticuerpos Anti-DsrS de conejo usando como antígeno la proteína DsrS4, mediante Western Blot	49
Figura 24. Análisis de la adsorción de anticuerpos contaminantes y titulación de anticuerpos Anti-DsrS mediante western Blot utilizando como antígeno la DsrS recombinante	50
Figura 25. Efecto del pH, uso de inhibidores de proteasas y tiempo de almacenamiento a 4°C, en el procesamiento proteolítico de la DsrS de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> B512F, mediante análisis de Western Blot utilizando anticuerpos Anti-DsrS	56
Figura 26. Efecto de las condiciones de almacenamiento en la actividad de la DsrS nativa, almacenada sin inhibidores de proteasas a diferentes valores de pH	57
Figura 27. Efecto del pH, uso de inhibidores de proteasas y tiempo de almacenamiento a temperatura ambiente, en el procesamiento proteolítico de la DsrS de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> B512F, mediante análisis de Western Blot utilizando anticuerpos Anti-DsrS	57
Figura 28. Efecto de las condiciones de almacenamiento en la actividad de la DsrS nativa, almacenada sin inhibidores de proteasas a diferentes valores de pH	58
Figura 29. DsrS recombinante fusionada al N-terminal a la tiorredoxina y al C-terminal a una etiqueta de histidinas	59
Figura 30. Análisis del fenómeno proteolítico de la DsrS recombinante al momento de la extracción de la enzima	60
Figura 31. Efecto de los inhibidores de proteasas en la proteólisis de la DsrS recombinante, durante el proceso de producción y extracción de la enzima	61
Figura 32. Efecto del pH en la actividad de los inhibidores de proteasas sobre la proteólisis de la DsrS recombinante	62
Figura 33. Efecto del pH, uso de inhibidores de proteasas y tiempo de almacenamiento a 4°C, en el procesamiento proteolítico de la DsrS recombinante, mediante análisis de Western Blot utilizando anticuerpos Anti-His y Anti-DsrS	64
Figura 34. Efecto de las condiciones de almacenamiento en la actividad de la DsrS recombinante, almacenada sin inhibidores de proteasas a diferentes valores de pH	65
Figura 35. Efecto del pH, uso de inhibidores de proteasas y tiempo de almacenamiento a temperatura ambiente, en el procesamiento proteolítico de la DsrS recombinante, mediante análisis de Western Blot utilizando anticuerpos Anti-His y Anti-DsrS	66

Figura 36. Efecto de las condiciones de almacenamiento en la actividad de la DsrS recombinante almacenada sin inhibidores de proteasas a diferentes valores de pH	66
Figura 37. Comparación del fenómeno proteolítico de la DsrS nativa y recombinante, almacenadas 150 días pH 5.2 a 4°C	67
Figura 38. Purificación de la DsrS recombinante por cromatografía de afinidad a níquel. Proteínas teñidas con azul de coomassie	68
Figura 39. Monitoreo del fenómeno proteolítico de la DsrS recombinante, semipurificada y almacenada a temperatura ambiente, mediante análisis de Western Blot utilizando anticuerpos Anti-His y Anti-DsrS	69
Figura 40. Monitoreo del fenómeno proteolítico de la DsrS recombinante, semipurificada y almacenada a 4°C durante 75, mediante análisis de Western Blot utilizando anticuerpos Anti-DsrS y Anti-His	70
Figura 41. Análisis de las fracciones TDH1 y TDH2 purificadas por electroelusión	71
Figura 42. Western Blot utilizando anticuerpos Anti-DsrS de las fracciones TDH1 y TDH2 purificadas por electroelusión, almacenadas a 4°C sin inhibidores de proteasas por un período de 20 días	72
Figura 43. SDS-PAGE 2D de la fracción TDH 1 (Formas de 170 y 150 kDa). Analizada al momento de la electroelusión mediante Western Blot utilizando anticuerpos Anti-DsrS	73
Figura 44. SDS-PAGE 2D de la fracción TDH 1 (Formas de 170 y 150 kDa) a 5 días de almacenamiento a temperatura ambiente y pH 5.2 mediante Western Blot utilizando anticuerpos Anti-DsrS	74
Figura 45. SDS-PAGE 2D de la fracción TDH 1 (Formas de 170 y 150 kDa) a 10 días de almacenamiento a 4°C y pH 5.2 mediante Western Blot utilizando anticuerpos Anti-DsrS	75
Figura 46. Ensayos sobre la proteólisis de la EIS3 realizados por Ortiz-Soto y Rodríguez A. A) Caracterización del fenómeno proteolítico mediante SDS-PAGE y zimograma. B) Zimograma de doble dimensión de la EIS3	76
Figura 47. Construcción pThioBarrilHis, que expresa el dominio catalítico de la DsrS fusionada en el N-terminal a tiorredoxina y en el C-terminal a una etiqueta de histidinas	77
Figura 48. Expresión del dominio catalítico de la DsrS	77
Figura 49. Análisis de western Blot utilizando anticuerpos Anti-Trx de la fracción soluble e insoluble, determinando la localización del dominio catalítico de la DsrS	78
Figura 50. Determinación de la actividad hidrolítica del dominio catalítico de la DsrS mediante HPLC	78

Figura 51. Perfil de proteínas en la purificación del dominio catalítico de la DsrS por cromatografía de afinidad a níquel	79
Figura 52. Perfil proteolítico del dominio catalítico de la DsrS al momento de la purificación por cromatografía de afinidad a níquel	79
Figura 53. Comparación del procesamiento proteolítico del dominio catalítico de la DsrS al momento de la extracción y a los 75 días de almacenamiento a 4°C, mediante Western Blot utilizando anticuerpos Anti-His	80
Figura 54. Comparación del procesamiento proteolítico del dominio catalítico de la DsrS al momento de la extracción y a los 75 días de almacenamiento a 4°C, mediante Western Blot utilizando anticuerpos Anti-DsrS	80

RESUMEN

La dextranasa DsrS (EC. 2.4.5.1) de *Leuconostoc mesenteroides* B512F pertenece a la familia 70 de las glucosidohidrolasas y sintetiza dextrana mediante reacciones de transglucosidación utilizando sacarosa como sustrato. La dextrana es un polímero constituido por residuos D-glucopiranosil unidos por enlaces $\alpha(1-6)$ en su cadena principal y ramificaciones en $\alpha(1-3)$. Este polímero es de gran importancia a nivel industrial por sus aplicaciones en el área clínica, farmacéutica y alimenticia entre otras.

Hasta antes del aislamiento del gene *dsrS* que codifica para la dextranasa DsrS, existía una gran controversia en cuanto al peso molecular de esta enzima, ya que se observa un fenómeno de múltiple bandeo en las muestras analizadas por SDS-PAGE con actividad dextranasa. Se ha propuesto que esta diversidad de pesos moleculares reportados para la DsrS puede ser producto de la actividad proteolítica presente en las preparaciones, o bien, de inestabilidad en el RNAm con liberación prematura del ribosoma.

En nuestro grupo de trabajo ha surgido el interés por entender el fenómeno proteolítico que sufre la DsrS ya que además de la dificultad de contar con una forma pura de la enzima, la caracterización cinética es inexacta, ya que se observan cambios en las constantes cinéticas y en las propiedades reológicas del polímero sintetizado por las diversas fracciones proteolizadas activas.

El objetivo de este trabajo es contribuir al estudio de la naturaleza del fenómeno proteolítico que experimenta la DsrS (nativa y recombinante), analizando dos probables mecanismos de proteólisis: mediada por proteasas del hospedero o bien la autoproteólisis. La primera hipótesis, acción de proteasas del hospedero, se fundamenta en el trabajo de Sánchez y col. (1999) en el que se reporta la presencia de actividad proteolítica extracelular en *Leuconostoc mesenteroides* B-512F, misma fracción donde se localiza la enzima. La segunda hipótesis, autoproteólisis, se apoya en el hecho de que este fenómeno proteolítico es independiente del fondo genético y que en la enzima nativa la presencia de inhibidores de proteasas no inhibe totalmente este procesamiento. Por lo tanto, decidimos determinar si el fenómeno proteolítico continúa o se detiene cuando la dextranasa ésta pura, o al menos libre de proteasas.

Al identificar el fenómeno proteolítico tanto en la enzima nativa como en la enzima recombinante corroboramos que este procesamiento es independiente del fondo genético. Se demostró que el uso de inhibidores de proteasas durante la producción y extracción de la enzima recombinante no detienen el procesamiento autoproteolítico al que es sujeta esta enzima, sin embargo, retardan la velocidad de dicho procesamiento.

Se produjeron anticuerpos policlonales Anti-DsrS (dirigidos contra la dextranasa S) con la finalidad de contar con una nueva herramienta que permitiera tener una caracterización completa del fenómeno proteolítico de la DsrS. Con el uso de estos anticuerpos se demostró que la degradación proteolítica de la DsrS nativa y recombinante continua con el tiempo de almacenamiento, más allá de la observada con los análisis de actividad "in situ". Esto resulta en la degradación de las formas activas predominantes, dando lugar a un enriquecimiento de formas de bajo peso molecular. Como resultado de este fenómeno se observa una disminución en la actividad específica de la enzima recombinante llegando a la pérdida total de la actividad. Se determinó que en la enzima recombinante el fenómeno proteolítico se acelera al almacenar la enzima a temperatura ambiente y que las condiciones óptimas de almacenamiento de la enzima son a un pH 5.2 a una temperatura de 4°C, concordando con lo reportado por Sánchez y col. (1999) para la enzima nativa.

Mediante ensayos de electroforesis bidimensional de una fracción enzimática semipurificada se demostró que el fenómeno proteolítico de la DsrS resulta en varias formas proteolizadas con diferencias poco perceptibles en peso molecular, pero si evidentes en cuanto al punto isoeléctrico. Lo anterior sugiere que este fenómeno es un autoproteolisis no específico, procesivo donde pocos aminoácidos son eliminados de manera secuencial. Aportando con esto, evidencias a favor de la hipótesis en la cual se define a la proteólisis de la DsrS como un fenómeno de naturaleza autocatalítica. Sin embargo, a pesar de las evidencias recopiladas a lo largo de este proyecto, ensayos que demuestren de manera contundente la naturaleza autoproteolítica de este fenómeno son aún necesarios.

Mediante estudios proteolíticos del dominio catalítico de esta enzima libre de las regiones N y C-terminal se demostró que el fenómeno autoproteolítico se sigue presentando, sugiriendo que es en el dominio catalítico en el que se encuentra, además de la actividad glucosiltransferasa ya reportada, la actividad proteolítica que da lugar a la autocatálisis. Apartir de las estrategias experimentales desarrolladas en este proyecto, determinamos que el fenómeno autoproteolítico de la DsrS se favorece por la acción de algunas proteasas del hospedero heterólogo.

En conclusión, este proceso proteolítico combinado (autoproteólisis y proteasas del huésped heterólogo) de la dextranasa S de *Leuconostoc mesenteroides* B512F deriva en una gran variedad de formas, tanto activas como no activas, de diferente peso molecular y punto isoeléctrico. Este procesamiento proteolítico se presenta desde la producción y la extracción de la enzima y se incrementa con el tiempo y las condiciones de almacenamiento. El dilucidar la naturaleza de este fenómeno proteolítico nos permite extender la información obtenida a otras enzimas (Glicosiltransferasas) sujetas a procesamiento proteolítico.

INTRODUCCIÓN

Las glucansacarosas (glucosiltransferasas) de la familia 70 de las Glucosidohidrolasas son enzimas producidas por bacterias lácticas de los géneros *Leuconostoc*, *Lactobacillus* y *Streptococcus* (Moulis y cols. 2006a,b; Alsop y col. 1983; Arcot y col. 2002), las cuales a partir de sacarosa catalizan la transferencia del residuo glucosilo hacia otras moléculas aceptoras sintetizando un polímero llamado glucano (Monsan y col. 1995., Quirasco y col. 1999, Kralj y col. 2002). Los glucanos producidos por las glucosiltransferasas están constituidos por residuos D-glucopiranosilo, los cuales, difieren en tamaño, tipo de enlace y longitud de las ramificaciones dependiendo de la enzima y de la cepa productora.

La dextransacarasa DsrS (EC. 2.4.5.1) es una glucosiltransferasa extracelular producida por *Leuconostoc mesenteroides* B512F, que sintetiza el polímero dextrana a través de reacciones de transglucosilación utilizando como sustrato sacarosa. Este polímero está constituido principalmente por enlaces $\alpha(1\rightarrow6)$ en la cadena principal y presenta ramificaciones con enlaces $\alpha(1\rightarrow3)$. (López-Munguía y col. 1993; Remaud-Simeon y col. 1994; Monchois y col. 1999; Sánchez-González y col. 1999; Kralj y col. 2002). Dadas sus propiedades biológicas este fue uno de los primeros biopolímeros producidos a nivel industrial, y su síntesis a gran escala data de 1948. Hasta la fecha existe una gran cantidad de reportes literarios acerca de la variedad de aplicaciones, tanto en el área clínica, farmacéutica y alimenticia (Monchois y col. 1999; Mevhar, 2003 y Naessen y col. 2005).

Esta enzima al igual que otras glucosiltransferasas está constituida por 4 regiones: (1) un péptido señal, altamente conservado en el extremo N-terminal típico de bacterias Gram positivas; (2) una región variable de función aún no determinada; (3) un dominio catalítico (Barril TIM) altamente conservado y (4) un dominio que se propone está involucrado en la unión a polímero en la región C-terminal (Monchois 1999).

En 1989 Wilke-Douglas y col. aislaron el gene *dsrS* que codifica para la dextransacarasa de *Leuconostoc mesenteroides* B512F, que expresa una enzima de 1527 aminoácidos con un peso molecular de 170 kDa. Hasta antes del aislamiento de este gene existía una gran controversia en cuanto al peso molecular reportado para esta enzima, ya que se observaba un fenómeno de múltiple bandeo en las muestras analizadas por electroforesis SDS-PAGE con actividad dextransacarasa. Se ha propuesto que este fenómeno de bandeo múltiple con actividad dextransacarasa deriva de actividad proteolítica presente en los extractos proteico, que entre otros inconvenientes da como resultado una caracterización enzimática inespecífica.

Como resultado de este fenómeno de procesamiento proteolítico se observan cambios en las propiedades reológicas de la dextrana sintetizada, ya que el peso molecular de este polímero depende de la forma enzimática que lo produce (Sánchez-González y col. 1999). En el 2005 Argüello y col. identificaron en la enzima nativa sitios de procesamiento proteolítico, definiendo con esto la orientación de dicho procesamiento.

Al igual que en la enzima nativa, la enzima recombinante presenta varias formas de diferente peso molecular con actividad dextransacarasa derivadas del procesamiento proteolítico (Del Moral-Ventura, 2004; Malten y col. 2005). Por lo que, es probable que tanto la dextransacarasa nativa como la recombinante sean hidrolizadas por una actividad proteolítica asociada a la propia enzima. En el 2006 Moulis y col. Observaron que en la enzima recombinante la orientación de los cortes proteolíticos es diferente al reportado para la enzima nativa.

Dada la variedad de formas de diferente peso molecular con actividad dextransacarasa identificadas en las preparaciones de la enzima nativa como en la recombinante se han propuesto dos probables mecanismos responsables de la degradación proteolítica que experimenta la DsrS: la acción de las proteasas de hospedero heterólogo y/o una actividad autoproteolítica. La primera hipótesis, se fundamenta en el trabajo de Sánchez y col (1999) en el que se reporta la presencia de actividad proteolítica extracelular en la misma fracción donde se localiza la enzima. La segunda hipótesis, autoproteólisis, se apoya en el hecho de que este fenómeno proteolítico es independiente del fondo genético y que la presencia de inhibidores de proteasas no inhibe totalmente este procesamiento.

En la medida que se cuente con preparaciones de la enzima de alta pureza será posible aceptar o rechazar alguna de estas hipótesis, aunque, paradójicamente, la proteólisis hace muy complejo el proceso de purificación de una sola forma de la enzima.

El dilucidar el fenómeno proteolítico de la DsrS permitirá proponer estrategias que permitan su estabilización, así como extender la información obtenida a otras enzimas (Glucosiltransferasas) sujetas a procesamiento proteolítico.

I. ANTECEDENTES

I.1. DEXTRANA Y DEXTRANSACARASA

Las glucansacarosas de la familia 70 de las Glicosidohidrolasas (EC 2.4.1.5) son enzimas producidas por bacterias lácticas de los géneros *Leuconostoc*, *Lactobacillus* y *Streptococcus* (Moulis y cols. 2006a,b; Alsop y col. 1983; Arcot y col. 2002). A partir de la sacarosa catalizan la transferencia del residuo glucosilo hacia moléculasceptoras sintetizando un polímero llamado glucano (Tabla 1) (Monsan y col. 1995., Quirasco y col. 1999, Kralj y col. 2002). En los géneros *Leuconostoc* y *Lactobacillus* se requiere de la sacarosa para inducir la expresión de la enzima (Kralj S. y cols. 2002), mientras que, en el género *Streptococcus* estas enzimas se expresan de forma constitutiva (Neely y col. 1962., Monsan y col. 2001)

Los glucanos producidos por las glucosiltransferasas están constituidos por residuos D-glucopiranosil, los cuales difieren en tamaño, tipo de enlace y longitud de las ramificaciones (Figura 1) dependiendo de la enzima y de la cepa productora:

- El polímero **mutana** sintetizado por la enzima **mutansacarasa** esta formado por unidades de glucosa con enlaces $\alpha(1\rightarrow3)$ en la cadena principal y ramificaciones con enlaces $\alpha(1\rightarrow6)$ (Monsan y cols., 2001)
- El polímero **alternana** sintetizado por la enzima **alternansacarasa** en su estructura principal presenta enlaces $\alpha(1\rightarrow3)$ y $\alpha(1\rightarrow6)$ de forma alternada (Argüello-Morales y cols., 2000).
- El polímero **reuterana** sintetizado por la enzima **reuteransacarasa** esta constituido por enlaces $\alpha(1\rightarrow4)$ en la cadena principal y ramificaciones con enlaces $\alpha(1\rightarrow6)$ (Kralj, 2002)
- El polímero **dextrana** sintetizado por la enzima dextransacarasa está constituido principalmente por enlaces $\alpha(1\rightarrow6)$ en la cadena principal y presenta ramificaciones con enlaces $\alpha(1\rightarrow3)$. (Wilke-Douglas y col., 1989; Remaud-Simeon y col. 1994; Monchois y col. 1999).

La dextrana producida por la enzima dextransacarasa (DsrS) de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F fue uno de los primeros biopolímeros en ser producidos a nivel industrial. Sus aplicaciones son importantes en el área médica ya que por sus propiedades reológicas y osmóticas, la dextrana, ha sido utilizada como sustituto de plasma sanguíneo (Arcot y col. 2002), agente anticoagulante (sulfato éster de dextrana), así como en el tratamiento de anemia por deficiencia de hierro (dextrana férrica). La dextrana entrecruzada denominada Sephadex® se utiliza en el área de separación de compuestos y en la purificación de moléculas de importancia

bioquímica como: proteínas, ácidos nucleicos y polisacáridos (Naessens y col. 2005). En la industria de alimentos es utilizada como espesante, emulsificante y/o estabilizante (Monchois y col. 1999). En el área farmacéutica este polímero es utilizado como adyuvante, esto es, fármacos conjugados con dextrana (Mehvar, 2003).

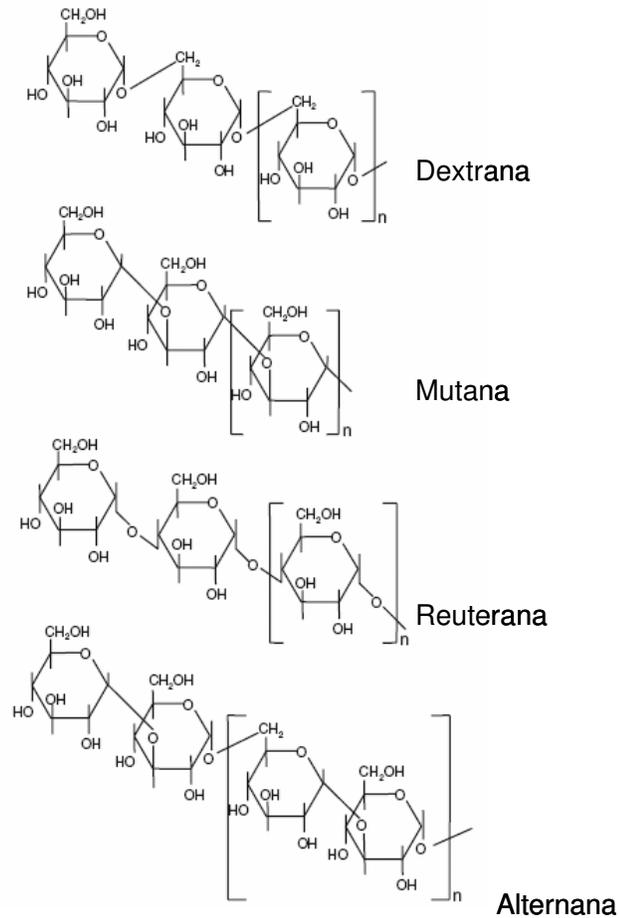


Figura 1.- Representación de las estructuras de los glucanos sintetizados por diferentes glucosiltransferasas de *Streptococcus spp.*, *Lactobacillus* y *L. mesenteroides* (Korakli y col., 2006).

De manera similar los oligosacáridos producidos por esta enzima tienen aplicaciones en el área de alimentos y agroalimentaria, farmacia y cosmetología, empleándose como estabilizantes, agentes bloqueadores, inmunoestimulantes o compuestos prebióticos capaces de estimular el crecimiento de la microbiota bacteriana (Remaud-Simeone y col. 1999) por mencionar algunas.

Tabla 1. Análisis comparativo del tamaño y la estructura del producto de las glucosiltransferasas de *Streptococcus spp.*, *Lactobacillus* y las de *Leuconostoc mesenteroides*.

Enzima	Peso molecular kDa	Tipo de polímero	Referencia
GtfB	150	87 % α (1-3) 13 % α (1-6)	(Shiroza y col., 1987)
GtfC	150	85 % α (1-3) 15 % α (1-6)	(Ueda y col., 1988)
GtfD	155	30 % α (1-3) 70 % α (1-6)	(Honda y col., 1990)
GtfG	170	40 % α (1-3) 60 % α (1-6)	(Vickerman y col., 1997)
GtfI	160	88 % α (1-3) 22 % α (1-6)	(Ferreti y col., 1987)
GtfJ	168	90 % α (1-3) 10 % α (1-6)	(Giffard y col., 1991)
GtfK	176	100 % α (1-3)	(Giffard y col., 1993)
GtfL	157	50 % α (1-3) 50 % α (1-6)	(Simpson y col., 1995a)
GtfM	171	5 % α (1-3) 95 % α (1-6)	(Simpson y col., 1995a)
GtfS	147	10 % α (1-3) 90 % α (1-6)	(Gilmore y col., 1990)
GtfT	163	27 % α (1-3) 73 % α (1-6)	(Hanada y col. , 1993)
DsrA	146	15 % α (1-3) 85 % α (1-6)	(Monchois y col., 1996)
DsrB	167	5 % α (1-3) 95 % α (1-6)	(Monchois y col., 1998a)
DsrE	313	10 α (1-3) 81 α (1-6)	(Bozonnet y col., 2002)
DsrS	170	5 % α (1-3) 95 % α (1-6)	(Wilke-Douglas y col., 1989)
DsrD	165	Bajo % α (1-3) Alto % α (1-6)	(Neubauer y col., 2003)
DsrC	164	4 % α (1-3) 96 % α (1-6)	(Argüello-Morales y col., 2000)
DsrT5	164	α (1-3) α (1-6)	(Funane y col., 2000)
Asr	229	50 % α (1-3) 50 % α (1-6)	(Argüello-Morales, 2000)
DsrP	160	75% α (1-6) 25% α (1-3)	(Chellapandian y col., 1989; Olvera-Carranza y col., 2007)
GtfA	199	α (1,4) α (1-6)	(Kralj y col., 2002)

I.2. MECANISMO DE REACCIÓN

No obstante la gran cantidad de trabajos sobre glucosiltransferasas el mecanismo de reacción aún no ha sido dilucidado en su totalidad. Estas enzimas catalizan la transferencia del residuo glucosilo proveniente del rompimiento de la sacarosa hacia otras moléculas aceptoras (Figura 2).

El paso clave de la transferencia de los residuos glucosilo es la formación de un complejo covalente enzima-glucosa. Este paso involucra como en el caso de la familia 13 de las glucosilhidrolasas, particularmente las α -amilasas, una triada catalítica que consta de dos ácidos aspárticos y un residuo de ácido glutámico (MacGregor y col.1996., Devulapalle y col. 1997).

De este complejo covalente enzima-glucosa el residuo glucosilo proveniente de la sacarosa es transferido a una serie de aceptores (Monsan y col. 2001) como los siguientes:

- Hacia la cadena de dextrana, transfiriendo una a una las unidades de glucosa.
- Hacia un carbohidrato o hacia un aceptor (no sacarosa) produciendo un oligosacárido o un glucoconjugado respectivamente.
- Hacia una molécula de H_2O , dando lugar a la hidrólisis de la sacarosa.
- Hacia una molécula de fructosa, dependiendo del sitio de transferencia para sintetizar nuevamente sacarosa (proceso llamado intercambio isotópico), o bien, para producir leucrosa: α -D-glucopiranosil-1-5-D-fructopiranososa.

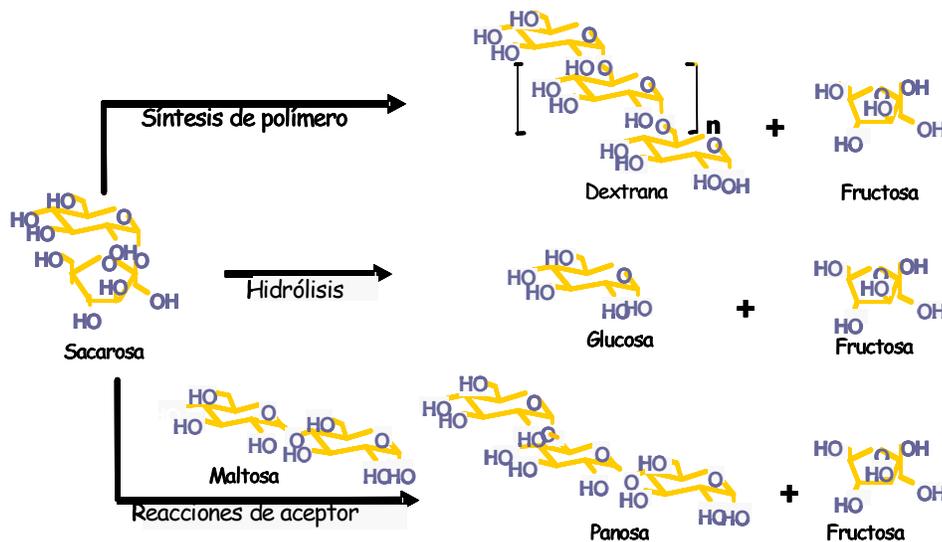


Figura 2. Reacciones catalizadas por la dextransacarasa (DsrS).

I.2.1 Polimerización: elongación hacia el extremo no reductor

Para la síntesis de la cadena de dextrana, el proceso es no-procesivo o multi-cadena, por adición de moléculas de glucosa al extremo no reductor de las moléculas aceptoras (Figura 3). La catálisis inicia con la hidrólisis de la sacarosa liberando glucosa y fructosa, la sacarosa en el medio actúa como aceptor de la molécula de glucosa liberada. Esta glucosilación de la sacarosa permite la formación de un oligosacárido, el proceso de elongación se continúa con la adición de residuos glucosilo hacia el extremo no reductor de los oligosacáridos previamente formados (Moullis y cols. 2006b).

Este mecanismo involucra la presencia de un ácido aspártico o un ácido glutámico que actúa como un grupo nucleofílico y otro residuo que actúa como un donador de protones. El grupo carboxilo puede hacer un ataque nucleofílico al C₁ de la glucosa de la sacarosa formando un complejo covalente enzima glucosa. El otro grupo ácido puede facilitar la liberación de fructosa por la donación de un protón al átomo de oxígeno involucrado en el enlace glucosídico. Este proceso permite también activar a otra molécula de glucosa por la retención del hidrógeno del grupo hidroxilo unido al C₆. Por lo tanto, en la biosíntesis del glucano la elongación ocurre en el extremo no reductor de la cadena de glucano, por lo que sólo un complejo covalente enzima-glucosa es necesario.

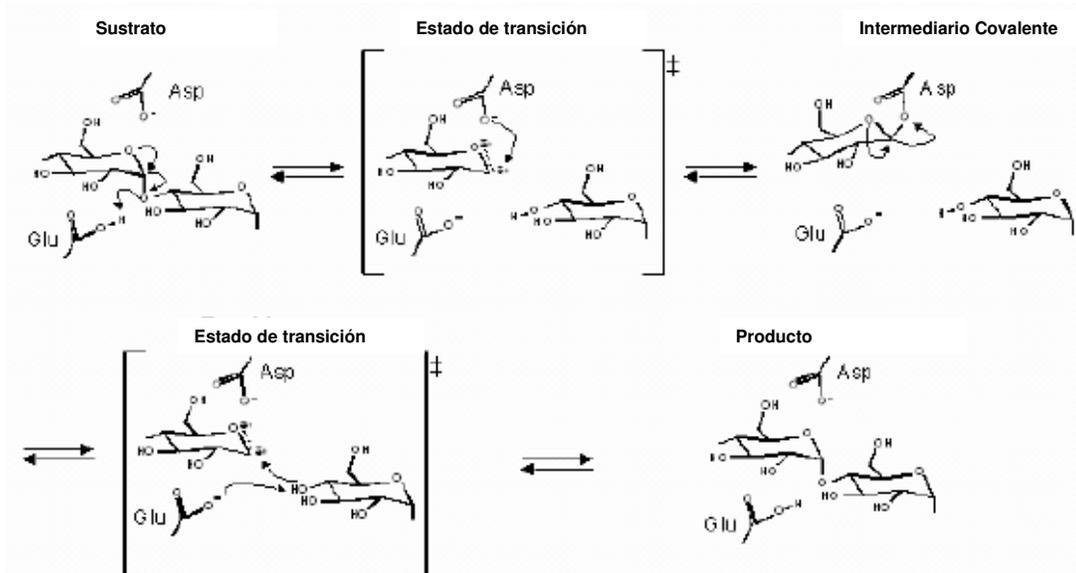


Figura 3. Mecanismo de polimerización de la dextransacarasa (DsrS) Moullis y col. 2006b.

1.2.2 Reacciones de aceptor

La adición de otros azúcares además de la sacarosa (tal como la maltosa) al medio de reacción permite la síntesis de oligosacáridos a expensas de la producción de dextrana de alto peso molecular. El residuo glucosilo de la sacarosa es desviado de la síntesis de dextrana y es transferido al grupo hidroxilo libre de estos azúcares, a los cuales también se denominan aceptores. Muchos azúcares actúan como aceptores, no obstante la maltosa e isomaltosa han probado ser los más eficientes para la síntesis de oligosacáridos por la dextransacarasa DsrS. Hasta hace poco estas reacciones se han explicado a partir del mecanismo en el que el aceptor interactúa con el complejo enzima-glucosilo o con el intermediario enzima-dextranosilo para liberar la glucosa o cadena de dextrana del sitio activo de la enzima, con la formación de un enlace covalente entre la glucosa o la dextrana y el aceptor. Cuando el aceptor desplaza la dextrana del sitio activo la polimerización de la cadena de dextrana es terminada (Figura 4).

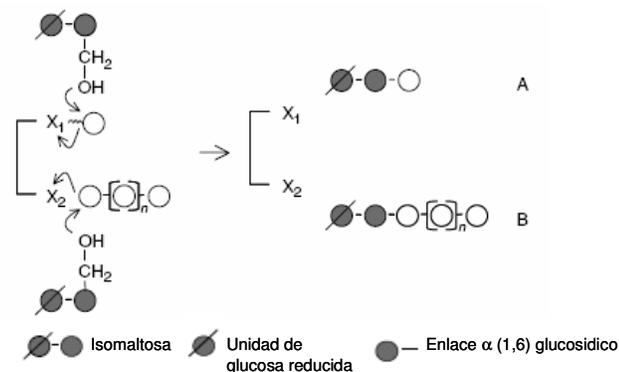


Figura 4. Reacciones de aceptor de la dextransacarasa. Un carbohidrato tal como isomaltosa desplaza la unidad glucosilo unida al sitio activo de la enzima formando un trisacárido, isomaltotriosa (A), y la unidad glucanosilo forma isomaltosa-extremo reductor terminando el glucano (Naessens y col. 2005).

Cuando una cadena de dextrana de alto peso molecular es el aceptor, un C_3 -OH de la cadena de dextrana aceptora ataca el C_1 de la unidad glucosilo o dextranosilo del complejo enzimático liberando glucosa o dextrana formando un enlace de ramificación entre la cadena de dextrana aceptora y la glucosa o cadena de dextrana de la enzima (Figura 5) (Naessens y col. 2005).

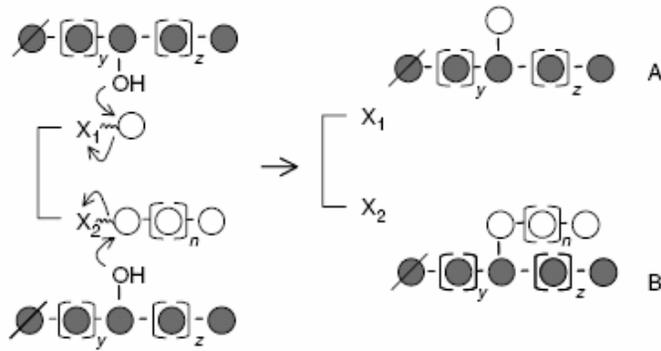


Figura 5. Mecanismo para la formación de enlaces ramificados en la dextrana. Una cadena exógena de dextrana desplaza la unidad glucosilo formando dextrana $\alpha(1,3)$ -glucosilo (A) o desplaza la unidad dextranosilo formando dextrana $\alpha(1,3)$ -dextranosilo (B) (Naessens y col. 2005).

Si bien, Naessens y col. (2006) proponen un mecanismo alternativo para las reacciones diferentes a la síntesis de dextrana, donde el modelo contempla la presencia de dos sitios de unión a sacarosa y otro de unión para aceptores (Figura 6). Esta conclusión se derivó de observar que los aceptores eficientes no inhibieron competitivamente la unión de la sacarosa. De esta manera se postuló la existencia de un sitio de unión para los aceptores, separado del sitio de unión a sacarosa. Se desconoce el número de sitios de unión a aceptores pero podría haber más de uno (Tanriseven y col., 1992).

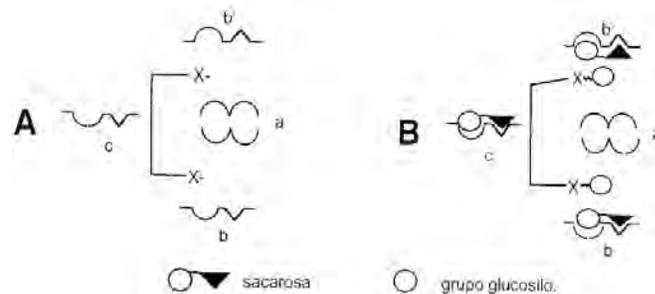


Figura 6.- Modelo estructural del sitio activo de la dextranasa propuesto por Tanriseven y Robyt (1992). A) La dextranasa activa muestra un sitio de unión a aceptores (a), dos sitios de alta afinidad para sacarosa (b y b') y un sitio alostérico de unión a sacarosa de baja afinidad (c). B) Enzima inhibida alostéricamente por una alta concentración de sacarosa, la conformación de la enzima cambia por lo tanto disminuye la síntesis de dextrana.

I.3. ESTRUCTURA DE LAS DEXTRANSACARASAS

Se han secuenciado cerca de 45 genes que codifican para glucosiltransferasas de *Leuconostoc*, *Streptococcus*, y *Lactobacillus* y sus dominios catalíticos se han identificado por comparación con las enzimas de la familia 13 de las glucosidohidrolasas (familia de las α -amilasa) (Tabla 1). Ambas familias, la familia de las α -amilasa como la familia de las glucosiltransferasas, muestran mecanismos de reacción y características estructurales similares. Estos resultados permitieron clasificar a la dextrantransferasa dentro de la familia 70 de las glucosidohidrolasas (GH) (Naessen y col. 2005., Fabre y cols. 2006).

Estas enzimas presentan un peso molecular en promedio de 165 kDa y muestran una estructura muy similar entre sí (Figura 7). En la región N-terminal presentan un péptido señal seguido de una región variable (a excepción de la DsrA que carece de esta región) y una región catalítica de aproximadamente 900 aminoácidos (a excepción de la DsrE que posee 2 dominios catalíticos) altamente conservada entre estas enzimas (Funane y col. 1993., Shimamura y col. 1994, Monchois y col. 1996., Bozonnet y col. 2002). En la región C-terminal se localiza un dominio que está constituido por una región de entre 300 y 400 aminoácidos donde se encuentran secuencias repetidas directas. Se ha sugerido que este dominio participa en la unión al polímero y como anclaje a la superficie celular (Monchois y col. 1999., Monsan y col. 2001; Fabre y col. 2006).

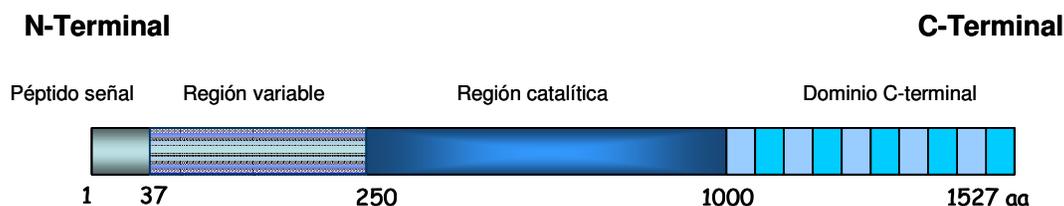


Figura 7.- Esquema estructural de las dextrantransferasas.

I.3.1. Péptido señal

Las dextrantransferasas presentan un péptido señal de entre 35 y 39 aminoácidos típico de bacterias Gram positivas (von Heijne y col. 1989) formado por una parte básica hacia el extremo amino seguida por una región hidrofóbica y más polar hacia el carboxilo del mismo (Izard y col. 1994). El péptido señal está altamente conservado entre las glucosiltransferasas mostrando una identidad del 42%. Esta alta identidad sugiere que estas enzimas usan la misma vía de secreción tanto en *Leuconostoc* sp. como en *Streptococcus* (Monchois y col. 1999).

I.3.2. Región variable

Después del péptido señal sigue una región no conservada denominada “variable”, la cual se propone tiene un papel importante en el mecanismo de elongación del polímero (Moulis y col. 2006b). Bozonnet y col. (2002) encontraron siete secuencias repetidas directas en la región variable de la DsrE, a las cuales en su conjunto llamaron motivo S. Este tipo de organización se encontró también en la DsrT de *L. mesenteroides* B512F al cual denominaron motivo “T”. Dados los hallazgos recientes ha surgido el interés de investigar cual es la función de esta región.

En la secuencia aminoacídica de la región variable de la DsrS *L. mesenteroides* B512F se localizaron unidades de repetición denominadas A, las cuales están también localizadas en el dominio de unión a polímero (región C-terminal). Mediante estudios de variantes truncadas, donde se eliminan estas unidades de repetición A, se determina que estas juegan un papel importante en el mecanismo de polimerización de la enzima (Moulis y cols. 2006b). Olvera y col. (2007) aislaron el gene *dsrP* que expresa la dextransacarasa DsrP e identificaron en la región variable de esta proteína las unidades de repetición ya reportadas por Bozonnet, presentando evidencia de que estas unidades de repetición constituyen un elemento estructural de anclaje celular.

I.3.3. Región catalítica

La región catalítica es la porción siguiente a la región variable, la cual está constituida por aproximadamente 900 aminoácidos. Dentro de esta región se encuentran los residuos conocidos como tríada catalítica. Estudios de predicción realizados con la GtfS de *S. downeii* Mfe 28 la tríada catalítica corresponde al Asp₄₃₇, Glu₄₇₅ y Asp₅₄₇ de la GtfS, los cuales se encuentran conservados en todas la glucosiltransferasas (Monchois y col. 1999).

Mooser y col. (1991) aislaron y analizaron mediante espectrofotometría de masas un péptido de la Gtfl y GtfS de *S. sobrinus* (Asp-Ser-Ile-Arg-Val-Asp-Ala-Val-Asp-) y demostraron que el residuo interno del Asp₄₄₉ realiza un enlace éster con el residuo glucosilo. Estudios posteriores mostraron que al mutar este residuo se eliminó la actividad dextransacarasa (Devulapalle y col. 1997). Mutaciones homólogas se realizaron en el Asp₄₅₁Thr y Asp₄₅₁Asn de la GtfB (Kato y col. 1992) así como el Asp₄₅₃Asn de la Gtfl de *S. downei* (Devulapalle y col. 1997): en ambos casos los cambios suprimieron la actividad dextransacarasa. Para *L. mesenteroides* el cambio de Asp₅₅₁Asn de la DsrS también eliminó la síntesis de glucano y de oligosacáridos demostrando que este residuo es esencial para la catálisis. Existen otros residuos importantes en la actividad de la DsrS, que al ser modificados dan lugar a un cambio en la actividad enzimática: las mutaciones Asp₅₁₁Asn y Asp₅₁₃Asn suprimen por completo la actividad de la enzima (Monchois

y col. 1997) e His₆₆₁Arg provocan una disminución considerable en la síntesis de glucano y oligosacáridos (Tsumori y col. 1997).

Para la DsrP de *L. mesenteroides* IBT-PQ el análisis de la secuencia aminoacídica sugiere que la triada catalítica puede corresponder a Asp₄₇₃, Asp₅₈₉ y Glu₅₁₁ (Olvera y col. 2007).

I.3.4. Región C-terminal

Posterior a la región catalítica se localiza un dominio C-terminal que consta de aproximadamente 500 aminoácidos. Se ha propuesto que este dominio está involucrado en la unión al polímero, y al parecer ésta involucrado en la actividad de las enzimas ya que la eliminación de este dominio resulta en una pérdida total de la actividad (Monchois y col. 1998b). Sin embargo, pareciera que el papel de este dominio varía de acuerdo a la enzima, ya sea interactuando con el polímero y/o la pared celular, como describiremos más adelante (Fabre y col. 2006).

Dentro de esta región se localizan secuencias repetidas directas, las cuales han sido agrupadas en cinco clases: A, B, C, D y N (Tabla 2) de acuerdo a la secuencia que presentan (Russell y col. 1987, Ferreti y col. 1987, Giffard y col. 1991 y Monchois y col. 1997). El número y disposición de estos elementos repetidos es específico de cada enzima.

Tabla2. Unidades de repetición localizadas en la región C-terminal de la glucosiltransferasas.

Unidad de repetición	Secuencia aminoacídica
A	WYYFN _x DGQAATGLQTIDGQTVFDDNG _x QVKG
B	VNGKTYFYGSDGTAQTQANPKGQTFKDGSGVLRFYNLEGQYVSGSGWY
C	DGKIYFFDPDSGEVVKNRFV
D	GGVKNADGTYSKY
N	YYxAxQGxxxL

A partir del análisis de las secuencias de diferentes unidades repetitivas Giffard y cols. (1994) propusieron que las unidades A, B, C y D provienen de una secuencia consenso "YG". Hasta el momento se desconoce con certeza la función de estas unidades, pero se sabe que si se eliminan una o varias de ellas puede alterarse la síntesis de glucano como es el caso de la DsrS de *L. mesenteroides* B-512 F a la cual se le deletaron 85 aminoácidos del dominio C-terminal y disminuyó un 25% de la actividad inicial (Monchois y col. 1998b). En contraste, la remoción de las tres unidades (A-C) de la GtfG fueron responsables de disminuir la actividad en un 85 % (Vickerman y col. 1996). Con base a lo anterior se sugiere que esta región es importante para el crecimiento de la cadena de polímero (Monchois y col. 1999).

Como se describió antes, las unidades de repetición A, localizadas en la región variable de la DsrE podría estar involucradas en el mecanismo de polimerización de esta enzima. De la misma forma en la región C-terminal de la DsrE se identificaron 12 unidades de repetición A y C de manera alternada, con estas unidades (A-C) además de tres supuestos sitios de unión a pared celular (CW). Estos sitios muestran homología con las unidades CW localizadas en el dominio C-terminal de la autolisina LytA de *Streptococcus pneumoniae* reportada por Fernández-Tornero y cols. (2001). Sugiriendo que este dominio puede estar involucrado en el anclaje de la enzima (DsrE) a la pared celular, dado que la enzima nativa se encuentra fuertemente asociada a la superficie de la pared celular de *L. mesenteroides* (Fabre y col. 2006).

Para la DsrP se han localizado en esta región unidades de repetición con identidad al dominio de unión a pared celular (CWD por sus siglas en ingles), similares a lo encontrados en LytA (Olvera y cols. 2007). En LytA estos sitios sirven para unir la proteína mediante el ácido lipoteicoico a la pared celular (Fernández-Tornero y cols. 2001).

Con base en los hallazgos anteriores, se sugiere que en algunas glucosiltransferasas, como la DsrE, DsrP y la DsrT, este dominio se encuentra implicado en el anclaje de la enzima a la pared celular de *L. mesenteroides* mediante sitios de unión a pared celular, además de la función ya descrita en la unión al polímero.

I.4. ESTRUCTURA TERCIARIA DE LAS DEXTRANSACARASAS

I.4.1 Dominio catalítico

Hasta el momento se ha determinado la estructura cristalográfica de la reuteransacarasa de *Lactobacillus reuteri*, la cual se reporto en Carbohydrate Bioengineering Meeting (2007), sin embargo esta estructura no se ha depositado en ninguna base de datos de estructuras tridimensionales, por lo que, para estudios más profundos se han realizado predicciones de su estructura terciaria. Estudios de predicción de estructura secundaria del dominio catalítico realizados por MacGregor y col. (1996), y Devulapalle y col. (1997) mostraron que las glucansacaratas poseen una estructura de barril TIM (α/β)₈, (Figura 8-A) parecida a las glucosidasas (incluyendo las α -amilasas), ciclodextrin glucanotransferasas (CGTasa), isoamilasa y glucano glucosidasas de *S. mutans*. Esta estructura se caracteriza por la presencia de 8 cadenas β -plegadas (E1-E8) localizadas en el interior de la proteína alternadas con 8 α -hélices (H1-H8) localizadas en la superficie de la enzima. La predicción de estas estructuras sugiere que el ácido aspártico involucrado en el complejo glucosil-enzima puede estar localizado cercano al C-terminal final de E4. Sin embargo, la localización de H1-H3 no es idéntica para las predicciones realizadas. En 1996 MacGregor y col. propusieron que en las glucansacaratas

ocurrió una permutación circular de estos elementos: la hélice NH₂ terminal puede ser el elemento H3 y los siguientes elementos E1-H1-E2-H2-E3, pueden estar lejos y fuera en la secuencia, en lugar de estar localizados en el principio. Según Devulapalle y col. (1997) estos primeros elementos pueden estar localizados en la región variable de las glucansacarosas.

I.4.2 Dominio C-terminal

Olvera y col. (2007) modelaron el dominio C-terminal (altamente conservado en las glucosiltransferasas) de la DsrP basándose en el dominio de unión a pared celular (CWD por sus siglas en ingles) de la autolisina A (LytA) de *Streptococcus pneumoniae*. La estructura cristalográfica de LytA se resolvió recientemente mostrando un plegamiento tipo solenoide el cual consiste exclusivamente de β -hairpins los cuales se empaquetan formando una superhélice con giro hacia la izquierda (Figura 9-B) (Fernández-Tornero y cols., 2001).

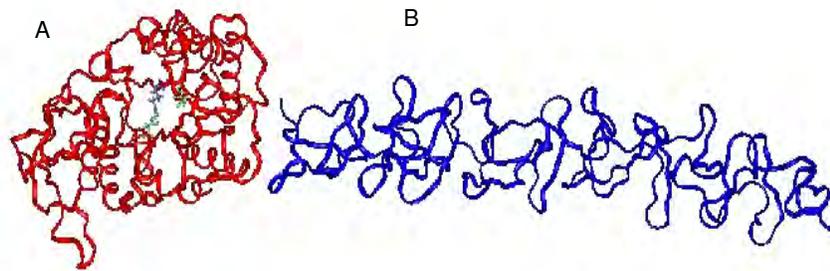


Figura 8. Modelamiento de la estructura terciaria de la dextranasa DsrP. A) Muestra la predicción del dominio catalítico el cual se propone como un plegamiento barril TIM. B) Modelamiento del dominio C-terminal de la DsrP para el cual se propone un plegamiento tipo solenoide.

De este modo se identificaron la DsrP 5 unidades de repetición con identidad al dominio de unión a pared celular (CW por sus siglas en ingles), similares a lo encontrados en LytA involucrados en la unión de la proteína mediante la colina del ácido lipoteicoico a la pared celular.

Estos propuestos 5 sitios de unión a pared celular en la DsrP se localizan en la misma cara del solenoide (región hidrofóbica) y dado que esta enzima se localiza unida a la pared celular Olvera y col. (2007) demostraron que estos residuos podrían estar interactuando con la pared celular, y concluyeron que en la DsrP el dominio C-terminal podría tener la doble función de unir la enzima a la pared celular a través de los sitios de unión a colina y unir la enzima al polímero mediante los residuos hidrofílicos localizados en la cara contraria del β -hairpin del solenoide (Figura 9)

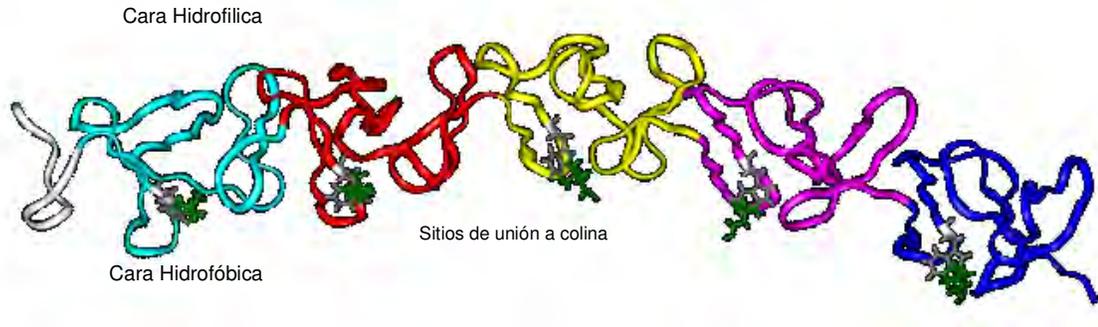


Figura 9. Estructura terciaria del dominio C-Terminal de la dextranasa DsrP. (Olvera y Col. 2007) Se proponen que la cara hidrofílica del β -hairpin tiene la función de unirse al polímero y la región hidrofóbica, donde se localizan los sitios de unión a pared celular, le permiten anclarse a la misma.

I. 5 SISTEMA PROTEOLÍTICO EN BACTERIAS

Las proteasas son una clase de enzimas, ampliamente distribuidas en los organismos vivos, las cuales ocupan una posición importante tanto en el campo fisiológico como de sus posibles aplicaciones en el comercial, estas enzimas proteolíticas catalizan la ruptura de enlaces peptídicos de otras proteínas (Gottesman 1996; Rao 1998). Ellas producen modificaciones en las proteínas blanco o sustrato con una alta especificidad y selectividad de. Lo anterior resulta en algunos casos en la activación de zimógenos por proteólisis limitada, así como, procesamiento y transporte de proteínas de secreción a través de membranas.

Las proteasas cumplen una gran variedad de funciones, extendiéndose desde el nivel celular hasta el nivel organismo y son responsables de los complejos procesos que involucran la fisiología normal de la célula, así bien como de aquellos procesos que involucran condiciones anormales. La clasificación de las proteasas se da de acuerdo a los siguientes criterios: a) tipo de reacción que catalizan, b) naturaleza química del sitio catalítico y c) la relación evolutiva de acuerdo a su estructura. De acuerdo a su sitio de acción pueden ser clasificadas en exopeptidasas y endopeptidasa, con base al grupo funcional presente en su sitio activo pueden ser clasificadas en serino proteasas, aspártico proteasas, metalo proteasas y cisteíno proteasas.

Exopeptidasas. Este tipo de proteasas actúan solo en los extremos de la cadena polipeptídica. De acuerdo a su sitio de acción, N- o C-terminal, pueden ser denominadas amino o carboxipeptidasas respectivamente.

Aminopeptidasas. Actúan en la región amino terminal (N-terminal) de la cadena polipeptídica, liberando aminoácidos simples, di o tripéptidos. En general son enzimas intracelulares.

Carboxipeptidasas. Actúan en la región carboxilo terminal (C-terminal) de la cadena polipeptídica liberando también aminoácidos simples o bien dipéptidos. Estas proteasas pueden ser divididas a su vez en: serin carboxipeptidasas, metalo carboxipeptidasas y cisteín carboxipeptidasas, de acuerdo a la naturaleza de los aminoácidos en el sitio activo de estas.

Endopeptidasas.

Estas enzimas se caracterizan por su actividad de hidrolizar enlaces preferencialmente entre péptidos localizados en regiones internas de la cadena polipeptídica, lejanos a los extremos N- y C-terminal. De acuerdo a su mecanismo catalítico pueden ser divididas a su vez en cuatro subgrupos: serino, aspártico, cisteíno y metaloproteasas.

Serino proteasas. Caracterizadas por la presencia de un grupo serino en su sitio activo, constituyen un grupo numeroso y ampliamente distribuido entre virus, bacterias y eucariontes, lo que sugiere que este tipo de enzimas son vitales para los organismos. Una característica importante de estas proteasas es la conservación de un residuo de glicina en la vecindad del residuo de serina catalítico en el motivo conservado: Gli-Xaa-Ser-Yaa-Gli.

Aspártico proteasas. Comúnmente conocidas como proteasas ácidas, son endopeptidasas que dependen de un residuo de ácido aspártico en su sitio catalítico. Se agrupan principalmente en 3 familias: 1) pepsina, 2) retropepsina y 3) enzimas de pararetrovirus. El sitio activo lo conforma el siguiente motivo conservado: Asp-Xaa-Gly donde Xaa puede ser Ser o Thr.

Cisteíno proteasas. Su actividad catalítica depende de un residuo de cisteína en su sitio activo. Con base a la especificidad pueden dividirse en 4 grupos: a) las del tipo papaína, b) tipo tripsina (más ampliamente estudiadas), c) ácido glutámico específicas y otras.

Metaloproteasas. Comprenden el grupo de proteasas con mayor diversidad catalítica. Se caracterizan por requerir un ión metálico divalente para su actividad. Cerca de 30 familias de metaloproteasas han sido reconocidas, de las cuales 17 son endopeptidasas, 12 exopeptidasas y sólo 1 muestra ambas actividades.

Función fisiológica de la proteasas

Este tipo de enzimas llevan acabo una gran variedad de funciones fisiológicas, jugando un papel importante en muchos procesos fisiológicos y patológicos tales como: catabolismo de proteínas, coagulación sanguínea, crecimiento y migración celular, rearreglo de tejidos, morfogénesis en el desarrollo, activación de zimógenos, liberación y/o activación de hormonas y péptidos farmacológicamente activos de proteínas precursoras, así como transporte y secreción de proteínas a través de membranas. En general, la proteólisis extracelular cataliza la hidrólisis de

proteínas grandes hacia moléculas pequeñas para su siguiente absorción por la célula, mientras que las proteasas intracelulares tienen un papel importante en la regulación del metabolismo. Algunas de las principales actividades en las cuales pueden participar las proteasas intracelulares son:

- Recambio de proteínas. Todas las células vivientes mantienen una velocidad dada de recambio de proteínas dado por el balance entre la degradación y la síntesis constante de las proteínas. El catabolismo de proteínas provee un gran número de aminoácidos utilizados como precursores en la síntesis de nuevas proteínas.
- Modificación de enzimas. La activación de zimógenos (precursores de enzimas y/o proteínas) por proteasas específicas representa un paso importante en la regulación fisiológica de muchos procesos de velocidad controlada tales como, generación de hormonas, ensamble de fibras y virus, coagulación sanguínea, fertilización del ovario por el esperma, así como la activación de ciertas proteasas. Por lo que este tipo de enzimas son esenciales para un correcto metabolismo y función celular. Por otro lado, la actividad proteolítica permite la inactivación catalítica de enzimas posterior al procesamiento proteolítico evadiendo de esta manera mecanismos que pueden estar comprometiendo la función celular (Rao 1998).

Sistema proteolítico en *Escherichia coli*

La proteólisis en *E. coli* sirve para librar a la célula de proteínas no plegadas o anormales, limitando el tiempo y cantidad hacia la disponibilidad de proteínas regulatorias importantes (Gottesman 1996).

El recambio de proteínas es un proceso celular normal que regula los niveles de proteínas específicas y elimina las proteínas anormales o tóxicas. La degradación intracelular de proteínas es un proceso metabólico activo con una importante función fisiológica (Ignatova y col. 2000).

En *E. coli* el evento de procesamiento de proteínas más frecuente es el corte del péptido señal durante el proceso de exportación. Por otro lado la degradación de proteínas no funcionales sirve como un sistema de limpieza. Mientras la mayoría de las proteínas se mantienen estables, las proteínas anormales son degradadas relativamente a una mayor velocidad tanto en procariontes como en eucariotes. Las proteínas anormales comprenden proteínas no plegadas y mutantes, proteínas sintetizadas con aminoácidos anormales y proteínas truncadas (Gottesman 1996).

Sistema proteolítico en las bacterias ácido-lácticas

Las bacterias lácticas, incluyen a miembros de los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Streptococcus*, los cuales son de gran importancia en la producción de una gran variedad de derivados lácteos. La degradación de proteínas como la caseína es de importancia en el desarrollo del sabor y de la textura de estos productos, de manera alterna los aminoácidos obtenidos de la degradación de proteínas se utilizan en la síntesis de nuevas proteínas, como fuente de energía y en el reciclado de cofactores reducidos. La proteólisis en las bacterias lácticas se ha estudiado en gran detalle por métodos genéticos, bioquímicos y estructurales. Los sistemas proteolíticos de los *Lactococci* y de los *Lactobacilli* son muy similares en sus componentes y en modos de acción. El sistema proteolítico esta compuesto por la PrtP, la cual es una serin proteasa extracelular (proteínasa), un sistema de transporte específico para di, tri y oligopéptidos (más de 3 residuos) y una gran número de peptidasas intracelulares (Kunji y col. 1996).

Savijoki y col. (2006) utilizaron como modelo a *L. lactis* en la proteólisis, transporte y regulación por caseína. Observando que además del procesamiento de nutrientes, la proteólisis celular juega un papel importante en el control de calidad de polipéptidos y en muchos circuitos reguladores, esto es, mantiene los niveles basales de proteínas regulatorias bajos y remueve aquellas proteínas grandes, así como aquellas no plegadas, no necesarias para el desarrollo y manutención celular. De igual forma el sistema proteolítico esta involucrado en la respuesta a cambios en la disponibilidad de nitrógeno en el balance celular.

I. 6 AUTOPROTEÓLISIS

Como regla general se ha asumido que la conversión de los precursores inactivos de una proteína hacia la proteína biológicamente activa es mediada por proteasas.

Hasta hace pocos años, el procesamiento pos-traducciona de enzimas, incluía procesos como la activación proteolítica de proenzimas, modificación de las cadenas aminoacídicas por fosforilación, alquilación o acilación, y conjugación con grupos protéticos. En fechas recientes se han identificado otro tipo de modificaciones catalizadas exclusivamente por la propia enzima, dentro de las que encontramos las autoproteólisis. La autoproteólisis es un evento de autoprosesamiento de la proteína que ha emergido como un nuevo mecanismo de modificación pos-traducciona que activa las funciones biológicas de la proteína o enzimas (Perler y col. 1997). Algunas proteasas presentan procesamiento autocatalítico, tal es el caso de Lactoceptina III de *L. lactis* antes denominada PtrP, en ausencia de calcio esta enzima experimenta cambios conformacionales, los cuales resultan en la exposición de un sitio autoproteolítico (aún no

identificado), el cual es enmascarado en presencia de calcio. Este sitio está probablemente localizado en el dominio B de la proteína (aproximadamente a 500 aminoácidos del C-terminal). Los aminoácidos involucrados en la especificidad de esta proteasa a la caseína están localizados en esta región. Flambard y Julliard (2000) demostraron que este procesamiento autoproteolítico de la Lactoceptina III afecta la especificidad en el reconocimiento de los sitios de corte de esta proteasa hacia la β -caseína.

Las serin proteasas extracelulares son degradadas autoproteolíticamente a altas temperaturas. Jang y col. (2001) identificaron en la secuencia aminoacídica de la proteasa alcalina AprP de *Pseudomonas* sp., dos sitios corte autocatalítico. La autoproteólisis de esta enzima resulta en la disminución de la vida media de la enzima en su temperatura óptima. Al modificar estos sitios de corte autocatalítico se logró disminuir el fenómeno autoproteolítico e incrementar la vida media de la enzimas hasta dos veces más, observándose a su vez, un incremento en la estabilidad y actividad catalítica de esta proteasa.

Este fenómeno es utilizado por varias proteínas, incluyendo a una familia de enzimas denominada N-terminal nucleófilo hidrolasa (Ntn). La Glucosilasparaginasa (GA) es un miembro de la familia arriba mencionada. Sin la autoproteólisis el precursor GA es inactivo al rompimiento del enlace β -N-aspartilglucosilamina de las glicoproteínas unidas por asparagina, resultando en un desorden genético conocido como aspartilglicosaminuria (AGU) (Qian y col. 2003).

La penicilina amidasa (PA) pertenece al grupo de enzimas bacterianas que deben procesarse proteolíticamente para obtener su actividad catalítica. Este proceso inicia con un paso intramolecular autoproteolítico, los péptidos resultantes se procesan posteriormente por fenómenos autoproteolíticos intra e intermolecular (Ignatova y col. 2000).

En estudios sobre la proteólisis de la Toxina B de *C. difficile*, Rieneke y col. (2007) definen que el procesamiento mediante el cual esta proteína activa su dominio catalítico es originado mediante un mecanismo autoproteolítico. Esto ocurre mediante la liberación del dominio N-terminal, que posee la actividad citotóxica del dominio C-terminal, el cual es el responsable de la unión a receptor, con lo que se incrementa su factor de virulencia y de patogenicidad.

I. 7 PROTEÓLISIS DE LA DEXTRANSACARASA (DsrS) DE *Leuconostoc mesenteroides* B512F

Hasta antes del aislamiento del gene *dsrS* que codifica para la dextransacarasa S (DsrS) de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512F existía una controversia respecto al peso molecular de esta enzima, habiéndose reportado un amplio rango de pesos moleculares (desde 65 kDa a 188 kDa) como consecuencia de observar múltiples bandas de actividad al analizar por electroforesis SDS-PAGE preparaciones y extractos con actividad dextransacarasa (Tabla 3). Este fenómeno se reporta también en otras enzimas de la familia de la dextransacarasa como la DsrE, DsrB, DsrP entre otras.

Tabla 3. Pesos moleculares reportados para la DsrS de *L. mesenteroides* B512F

Enzima	Peso (kDa)	Referencia
DsrS	188, 126 y 65	Kobayashi y col (1980)
DsrS	174 y 156	Millar y col. (1986)
DsrS	185, 130 y 65	Willemot y col. (1986)
DsrS	177 y 158	Wilke y col. (1989)
DsrS	177 y 158	Fu y col. (1990)
DsrS	173 y 155	Sánchez-González (2000)
DsrS	155, 129 y 48	Argüello y col. (2005)
DsrS	200, 188 y 165	Malten y col. (2005)

El gene *dsrS*, de ≈ 4.5 Kpb, codifica para la dextransacarasa S (DsrS) de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512F (Wilke-Douglas y col., 1989), esta localizado en un operon monocistrinico y el sitio de inicio de transcripción esta localizado 34pb río arriba del codón de inicio ATG (Quirasco y col. 1999). La enzima DsrS de 1527 aminoácidos tiene un peso molecular de ~ 170 kDa (Wilke-Douglas y col., 1989). Por lo que, se ha propuesto que la diversidad de pesos moleculares reportados para la DsrS puede ser producto de la actividad proteolítica presente en las preparaciones (Sánchez-González y col. 1999), inestabilidad en el RNAm, liberación prematura del ribosoma (Fabre y col. 2004) o bien un fenómeno de autoprosesamiento.

En nuestro grupo de trabajo ha surgido el interés por entender el fenómeno proteolítico que sufre la DsrS ya que debido a este procesamiento, entre otros problemas, la caracterización cinética de la enzima es inexacta (Monchois y col. 1998b). De igual forma se han demostrado cambios en algunas constantes cinéticas (por ejemplo la constante de inhibición K_i), así como cambios en las

propiedades reológicas del polímero sintetizado por las diversas fracciones (Sánchez y col. 1999).

Con la finalidad de determinar el origen de la diversidad de los pesos moleculares de la dextransacarasa (DsrS) de *Leuconostoc mesenteroides* B512F, Sánchez y col. (1999) realizaron estudios acerca del procesamiento proteolítico de esta enzima, incubándola a pH 5.2 y 4°C por un tiempo aproximado de 4 meses. Se encontró una forma activa de 155 kDa producto de la degradación proteolítica de la DsrS nativa activa de 173 kDa (Figura 10).

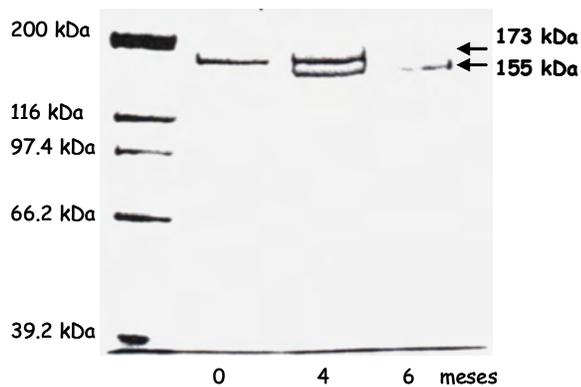


Figura 10. Procesamiento proteolítico de la DsrS de *L. mesenteroides* B512F. En las preparaciones frescas se observa una forma de 173 kDa, a 4 meses de almacenamiento a 4°C se observa la presencia de 2 formas de 173 y 155 kDa respectivamente y a 6 meses de almacenamiento a 4°C se observa la desaparición de la forma inicial y únicamente se observa la forma de 155 kDa (Sánchez y col., 1999).

El análisis cinético de las enzimas de 170kDa y 155 kDa mostró diferencias significativas en la constante de inhibición por sustrato (K_i), así como cambios en las características reológicas y en el peso molecular del polímero sintetizado por estas enzimas, concluyendo que las formas derivadas del procesamiento proteolítico de la DsrS nativa producen dextrana con diferentes propiedades.

Al modificar las condiciones de almacenamiento a 37°C y pH 7.0 se observó además una banda de 120 kDa producto de la degradación proteolítica de la banda nativa de 173 kDa. De manera interesante en estos extractos se encontró una proteína de aproximadamente 30 kDa con actividad proteolítica, la cual se propone podría estar implicada en el procesamiento proteolítico que sufre la DsrS.

Con base en lo anterior se concluyó que la obtención de las diferentes formas proteolizadas de la DsrS depende de las condiciones y el tiempo de almacenamiento, así como de la actividad proteolítica en los extractos de proteínas.

En estudios posteriores, Argüello y col. (2005) realizaron una proteólisis limitada de la DsrS de *L. mesenteroides* NRRL B512FMC, incubándola a temperatura ambiente por 60 días, encontrando

2 formas enzimáticas de aproximadamente 155 y 129 kDa (Figura 11), derivadas de una forma de 170 kDa. Con la finalidad de identificar los sitios de corte proteolítico de las formas de 155 y 129 kDa se secuenció el N-terminal obteniendo las secuencias FDKGSSDELT y FDKGSSDELTGLQS, respectivamente. Estos péptidos mostraron una identidad entre 90 y 92% con los péptidos encontrados en las posiciones F₂₁₀-T₂₁₉ y F₂₁₀-S₂₂₃ de la secuencia aminoacídica de la enzima nativa (Figura 12). Con base en lo anterior propusieron que la proteasa realiza el corte proteolítico entre los aminoácidos Y₂₀₉ y F₂₁₀ de la DsrS precursora, generando una enzima activa de menor peso molecular. Se designó al sitio Y₂₀₉F₂₁₀ (Figura 12) como un sitio de corte proteolítico en la DsrS nativa y al tetrapéptido YYFD como una secuencia de corte proteolítico.

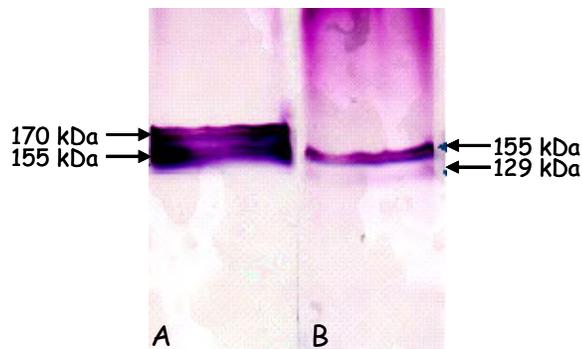


Figura 11. Procesamiento proteolítico de la DsrS (FMC) de *L. mesenteroides* B512FMC. En las preparaciones frescas se observan 2 formas de 173 y 155 kDa (A), a 2 meses de almacenamiento a temperatura ambiente se observa la desaparición de la forma precursora (170 kDa) y la presencia de una nueva forma de 129 kDa respectivamente (B).

Este corte en la región N-terminal de la proteína desencadenaría el procesamiento proteolítico de la enzima. Al presentar ambas formas la misma secuencia en el N-terminal se propone que los siguientes cortes proteolíticos en la DsrS nativa se dan en la región C-terminal (Argüello y col. 2005).

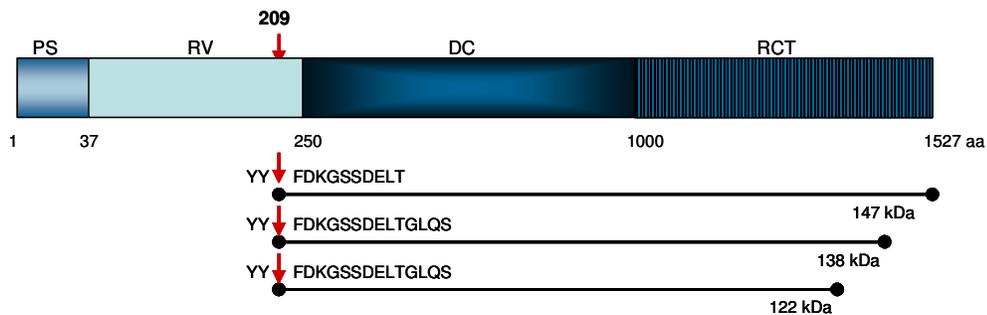


Figura 12. Sitios de escisión en la DsrS (FMC) identificados mediante secuenciación del N-terminal y localización de las secuencias aminoacídicas YF. PS) Péptido señal, RV) Región variable, DC) Dominio catalítico y RCT) Región C-terminal.

Con la finalidad de eliminar el procesamiento proteolítico de la DsrS nativa, el cual podría deberse a las proteasas de *L. mesenteroides* se expresó la enzima en *E. coli* como hospedero heterólogo. El gene *dsrS* se clonó en el vector de expresión pBAD/TOPO expresando la DsrS fusionada a la tiorredoxina en la región N-terminal. Se observó que la enzima recombinante mostraba también un procesamiento proteolítico, similar al de la enzima nativa (Figura 13-A), dado que la forma derivada del procesamiento proteolítico mostró un peso molecular (154 kDa) similar al reportado para la nativa. Se probaron diferentes fondos genéticos del hospedero heterólogo: *E. coli* DH5 α , BL21-DE3 (deficiente en las proteasas *La* y *OmpT*) y Top10 (Figura 13-B) buscando diferencias en el patrón proteolítico que esta presenta la enzima recombinante (Del Moral. 2004). Se observó que no existe diferencia en el perfil proteolítico de la DsrS recombinante expresada en las diferentes cepas de *E. coli* concluyendo que el procesamiento proteolítico de la dextransacarasa (DsrS) es independiente del fondo genético (Del Moral, 2004)

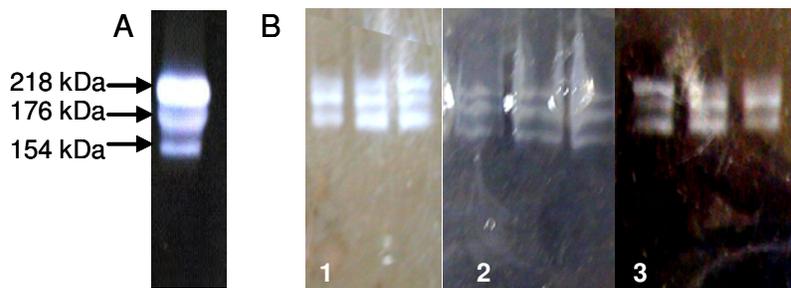


Figura 13. Fenómeno proteolítico de la DsrS recombinante analizado mediante zimogramas. A) Proteólisis de la DsrS recombinante. B) DsrS expresada en diferentes cepas de *E. coli*. (1. BL21, 2. DH5 α , 3. Top10). No se observan diferencias en la expresión de la DsrS recombinante o en el procesamiento proteolítico.

Malten y col. (2005) reportaron la expresión de la DsrS de *Leuconostoc mesenteroides* NRRLB512F en *Bacillus megaterium* con la finalidad de aumentar la producción de la enzima, identificando también el fenómeno de degradación proteolítica (Figura 14), reforzando la conclusión de que el fenómeno proteolítico es independiente del fondo genético.

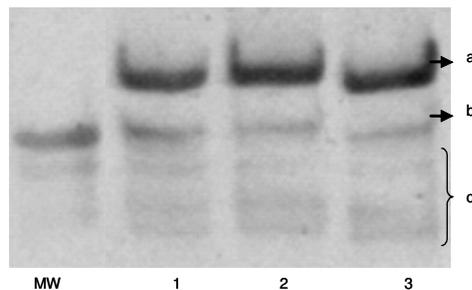


Figura 14. Producción de la DsrS en *Bacillus megaterium*. En el zimograma se observa la producción de la DsrS M. marcador de peso molecular. La forma "a" corresponde a la pre-DsrS, la forma "b" a la DsrS madura y las formas "c" corresponden a la degradación proteolítica de la enzima. 1, 2 y 3 corresponden al tiempo de inducción y expresión de la enzima.

Moulis y col. (2006a) con la finalidad de estudiar el fenómeno proteolítico de esta enzima clonaron el gene *dsrS* que codifica para dextransacarasa DsrS de *L. mesenteroides* B512F en el vector de expresión pBAD/TOPO Thiofusion, el cual expresa la enzima DsrS fusionada por el N-terminal a la Tiorredoxina y por el C-terminal a una etiqueta de histidinas. Al expresar la enzima recombinante en *E. coli* Top10 como hospedero heterólogo, realizaron ensayos de Western Blot utilizando anticuerpos Anti-Histag (Etiqueta de 6-histidinas) y Anti-Thiorredoxina. Con el uso de anticuerpos Anti-Histag, detectaron al momento de la extracción de la enzima 3 formas mayoritarias derivadas de la proteólisis de la DsrS (200 kDa) precursora (Figura 15) las cuales mantienen el dominio C-terminal. Sin embargo, usando anticuerpos Anti-Thiorredoxina, no identificaron a la enzima recombinante precursora (200 kDa) u otras formas derivadas de la proteólisis. A partir de estos resultados, los autores concluyen que el corte proteolítico de la DsrS recombinante se da en la región N-terminal.

De manera simultánea se secuenció la región N-terminal de las 3 formas dominantes derivadas de la proteólisis de esta enzima (Figura 15), con los siguientes resultados:

- Péptido 1 (37), de 165 KDa, secuencia TPSV, corte justo después del péptido señal.
- Péptido 2 (204), de 150 KDa, secuencia DNQT, corte al final de la región variable.
- Péptido 3 (468), de 121 KDa, secuencia NSPL, corte al inicio del dominio catalítico.

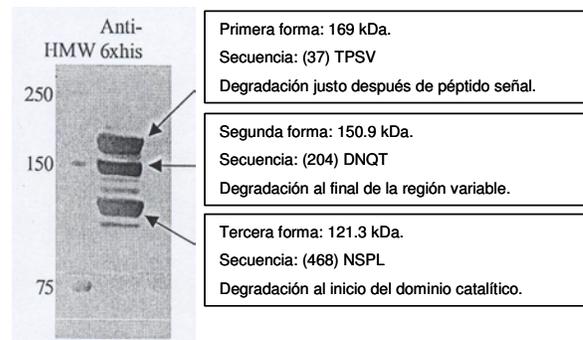


Figura 15. Secuencia aminoacídica de las 3 formas dominantes derivadas de la proteólisis de la DsrS recombinante. Mostrando las proteínas analizadas y las secuencias reportadas, así como la localización de los cortes proteolíticos en la secuencia aminoacídica de la DsrS recombinante. La proteína se expresó en *E. coli* BL21 Star.

A partir del análisis de estos resultados, y al observar varias formas identificadas en el Western Blot mediante el uso de anticuerpos Anti-HisTag la hipótesis propuesta por Argüello y col. (2005) para la DsrS nativa (página 32), no aplica para dextransacarasa DsrS recombinante. El sitio de corte proteolítico $Y_{209} \downarrow F_{210}$, identificado en la DsrS nativa no es un sitio de corte proteolítico en la DsrS recombinante y que la secuencia YF agrupada en el tetrapéptido YYFD no es una secuencia de corte específico en el fenómeno proteolítico de la DsrS recombinante.

De manera simultánea Moulis y col. (2006a) determinaron que, en la expresión y extracción de la DsrS recombinante, la adición de PMSF u otros inhibidores de proteasas no cambian el perfil proteolítico de esta enzima. Parece entonces que el procesamiento proteolítico en la enzima nativa y recombinante es inevitable y de naturaleza variable.

En análisis a la secuencia aminoacídica no se localizan sitios potenciales para la degradación proteolítica, tales como regiones que contienen aminoácidos aromáticos consecutivos (Lisina, Arginina e Histidina). De manera similar no se identifican codones de iniciación secundarios (GUG y UUG) precedidos por un supuestos sitio de unión a ribosoma secundario. Por lo que la degradación de la enzima puede deberse al uso de codones en el huésped, lo que resultaría en un fin prematuro de la traducción exponiendo a la enzima a la acción de proteasas no identificadas antes del plegamiento de la proteína. En la Figura 16 se resumen los sitios de corte proteolítico en la dextransacarasa reportados por Argüello y col. (2005) para la enzima nativa y Moulis y col. (2006a) para la enzima recombinante expresada en *E. coli*.



Figura 16. Sitios y secuencias de corte proteolítico identificados en la dextransacarasa (DsrS) de *L. mesenteroides* B512F nativa y recombinante.

Dada la información recopilada acerca del procesamiento proteolítico que sufre la DsrS nativa, al igual que la enzima recombinante, y los efectos de este fenómeno en la calidad del producto sintetizado, surge el interés de caracterizar y de definir el fenómeno proteolítico que sufre la enzima recombinante. El dilucidar el fenómeno proteolítico de la DsrS recombinante permitirá proponer estrategias que permitan su estabilización (y cristalización), así como extender la información obtenida a otras enzimas (Glucosiltransferasas) sujetas a procesamiento proteolítico

II. OBJETIVOS

II. 1 Objetivo general

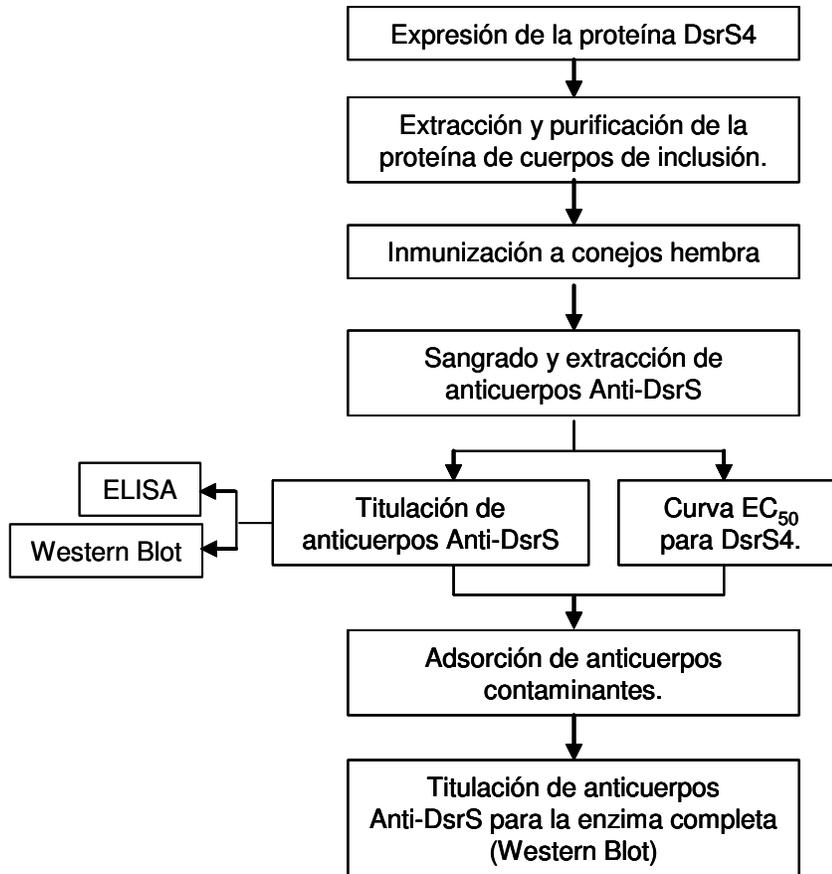
Estudiar el fenómeno proteolítico de la dextranasa (DsrS) de *Leuconostoc mesenteroides* B512F, tanto en su forma nativa como recombinante, con el fin de encontrar las condiciones adecuadas de almacenamiento y definir el origen del procesamiento proteolítico que sufre.

II.2 Objetivos específicos

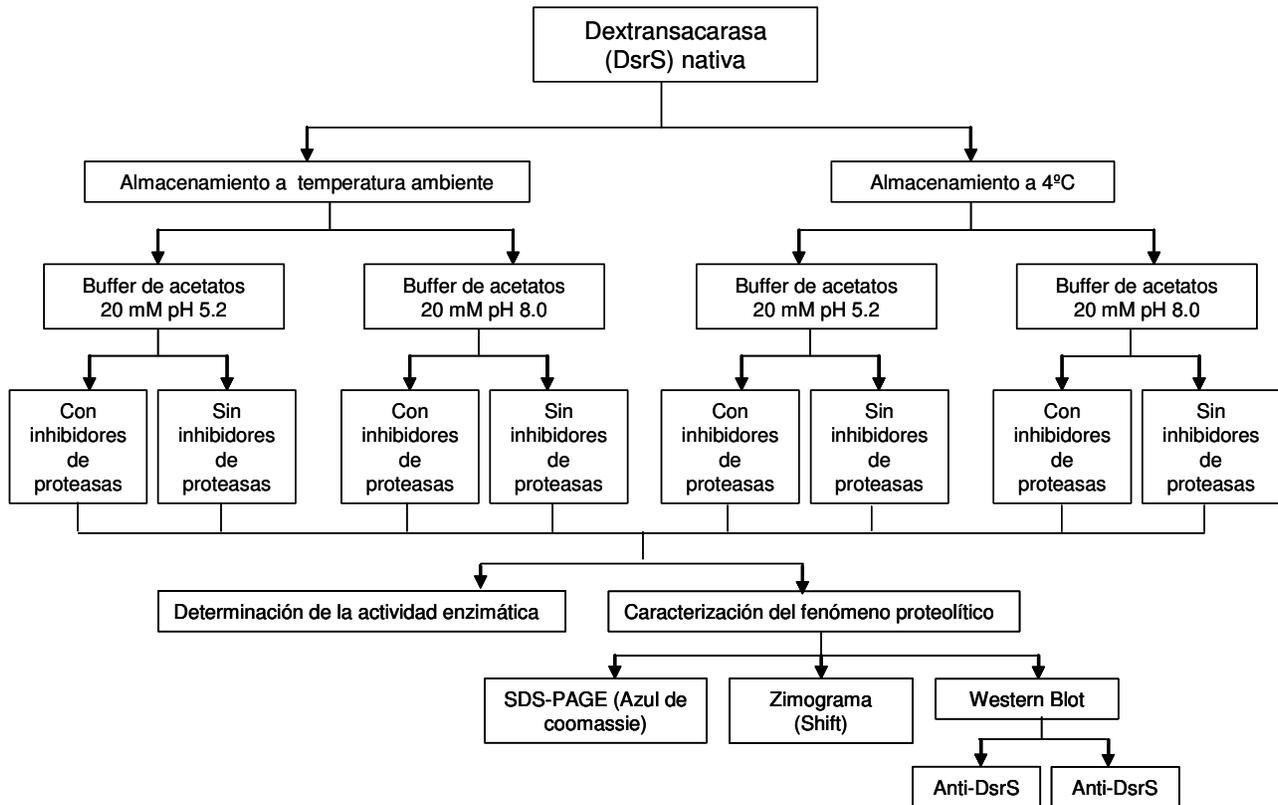
1. Determinar la influencia del proceso de producción, extracción y almacenamiento en el procesamiento proteolítico que sufre la DsrS nativa y recombinante.
2. Determinar la influencia de los inhibidores de proteasas, así como los parámetros pH, temperatura y tiempo de almacenamiento en el fenómeno proteolítico de la dextranasa (DsrS) nativa, caracterizando el patrón de proteólisis de esta enzima.
3. Determinar la influencia del uso de inhibidores de proteasas en el fenómeno proteolítico de la DsrS recombinante.
4. Determinar si procesamiento que sufre DsrS es de naturaleza autoproteolítica.
5. Definir el papel de los dominios C y N-terminal en el proceso proteolítico de la DsrS, mediante la construcción y análisis de versiones truncadas.

III. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

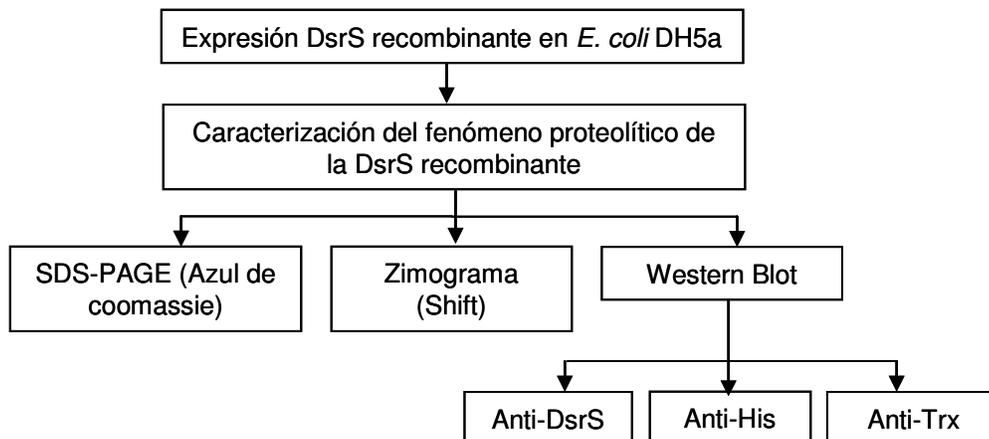
III. 1 Producción de anticuerpos Anti-DsrS



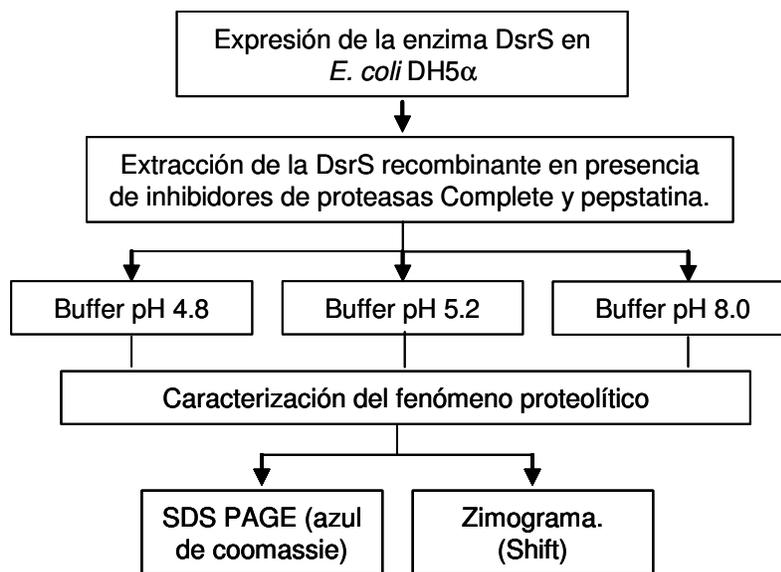
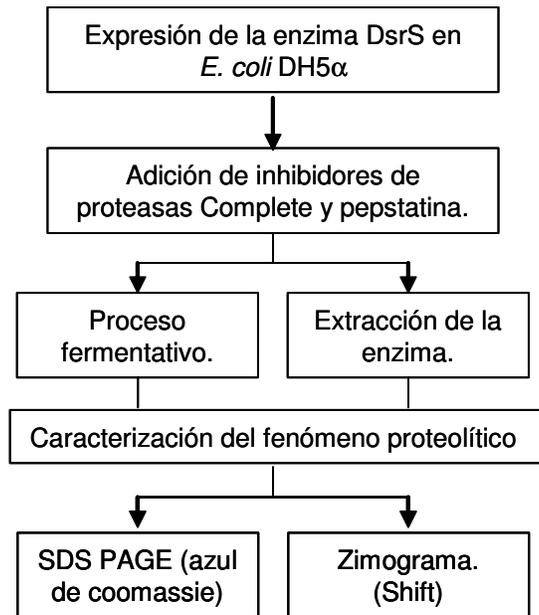
III. 2 Efecto del pH, temperatura, inhibidores de proteasas y almacenamiento en el fenómeno proteolítico de la dextranacarasa (DsrS) de *Leuconostoc mesenteroides* B512F



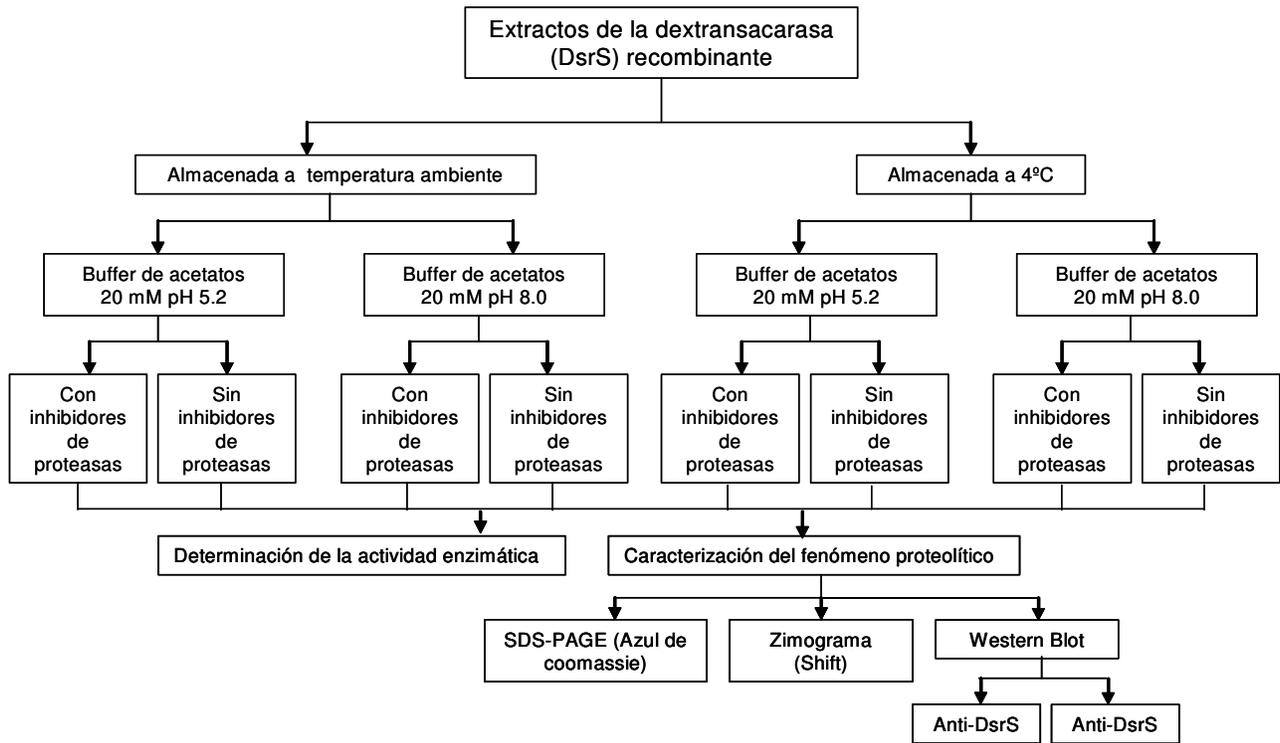
III. 3 Caracterización del fenómeno proteolítico de la DsrS recombinante



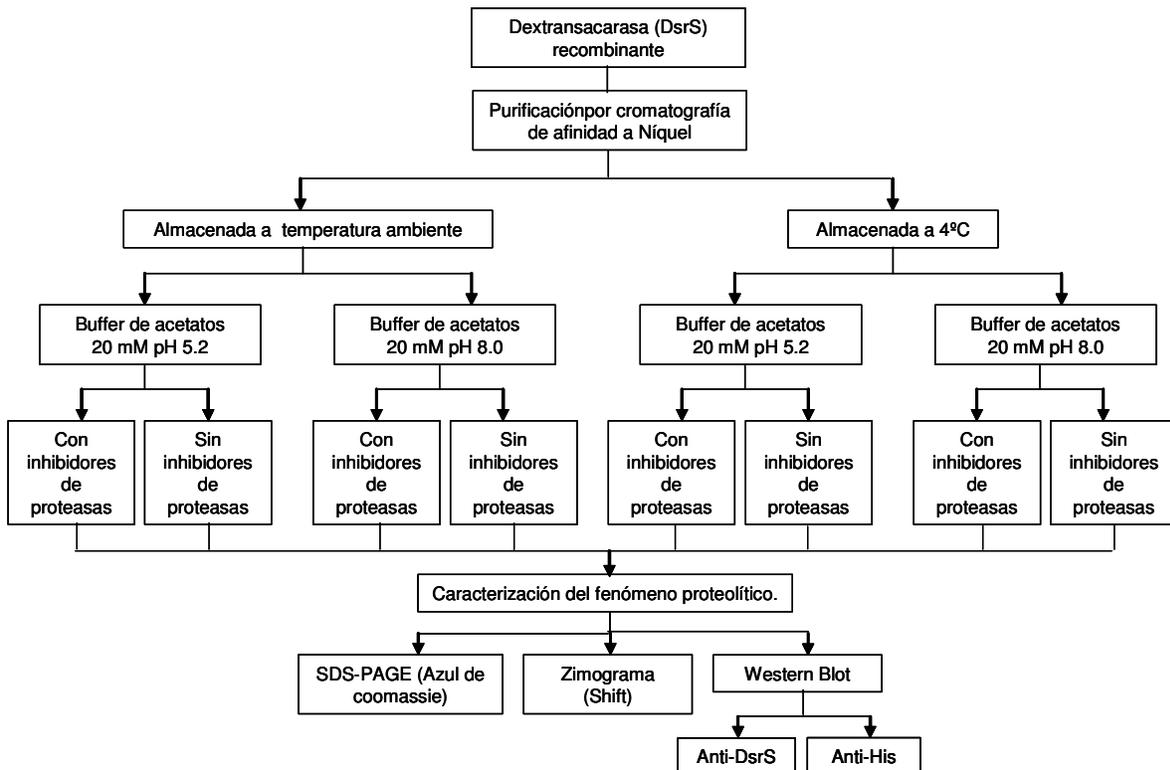
III. 4 Efecto de los inhibidores de proteasas y pH en el fenómeno proteolítico de la dextranacarasa (DsrS) recombinante



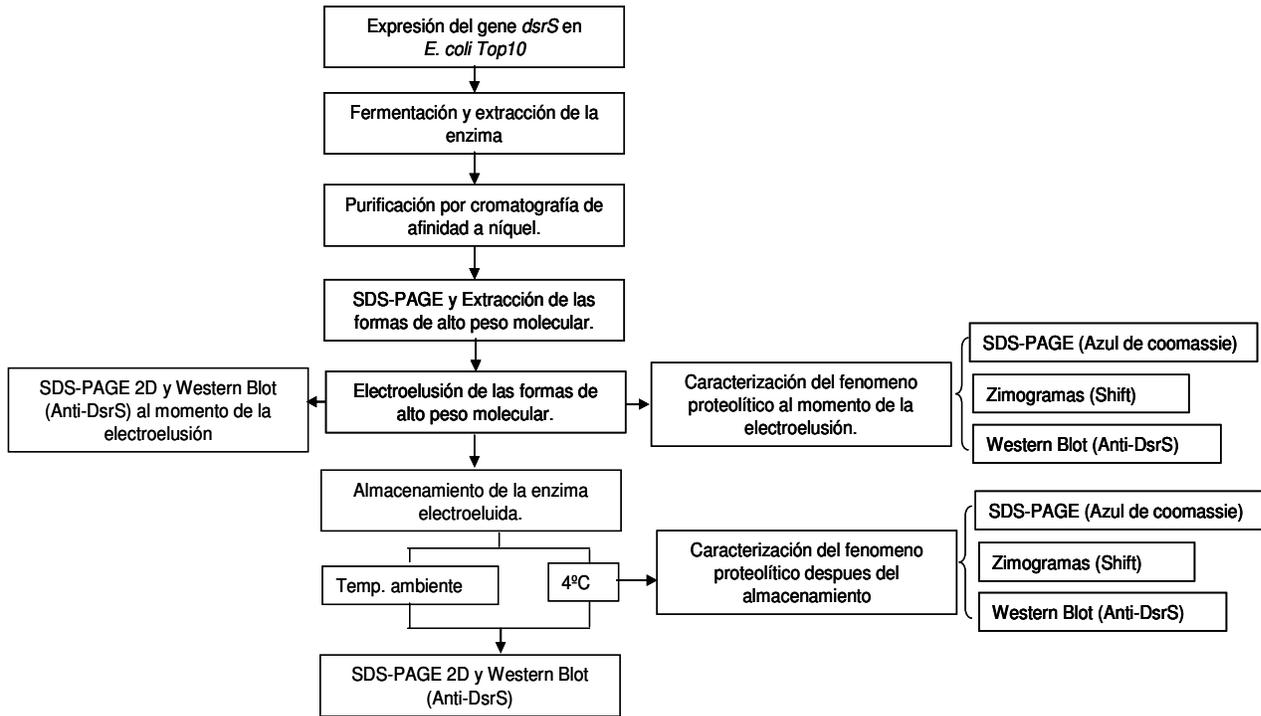
III. 5 Efecto del pH, temperatura, inhibidores de proteasas y almacenamiento en el fenómeno proteolítico de la dextranasa (DsrS) recombinante



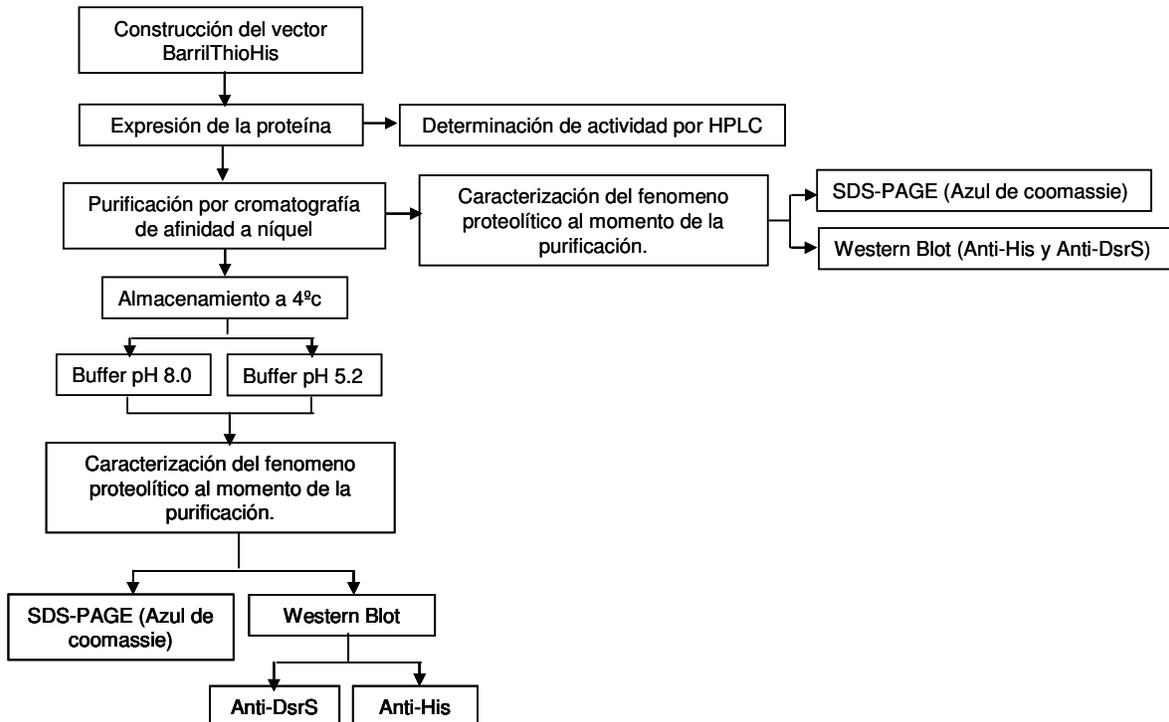
III. 6 Naturaleza del fenómeno proteolítico. Caracterización proteolítica de la enzima recombinante libre de proteasas



III.7 Naturaleza del fenómeno proteolítico de la DsrS. Análisis en SDS-PAGE 2D



III. 8 Papel de los dominios N y C-terminal en el procesamiento proteolítico de la DsrS



IV. MATERIALES Y MÉTODOS

IV.1. Cepas bacterianas

La cepa *Leuconostoc mesenteroides* B512F se conservó a -20°C en una solución de glicerol al 30% (v/v), la cepa se cultivó en el medio *L. mesenteroides* (LM) a 30°C y a 200 rpm.

Las cepas hospederas de las construcciones realizadas fue *E. coli* DH5 α , *E. coli* BI21(DE3) y *E. coli* Top10 con los siguientes genotipos:

***E. coli* DH5 α :** $\Delta(mcrA)183$, $\Delta(mcrCB\text{-}hsdSMR\text{-}mrr)173$, *endA1*, *supE44*, *thi-1*, *recA1*, *gyeA96*, *relA1*, *lac*, [F' *proAB*, *lacIZ* Δ M15, Tn10 (*tet*)]

***E. coli* BI21 (DE3):** BF⁻ *ompT* *hsdS*(r_B⁻ m_B⁻) *dcm*⁺ Tet^r gal λ (DE3) *endA* Hte [argU ileY leuW Cam^r]

***E. coli* Top10:** F⁻ *mcrA* Δ (*mrr*-*hsdRMS*-*mcrBC*) Φ 80/*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *recA1* *deoR* *araD139* Δ (*ara-leu*) 7697 *galU* *galK* *rpsL* (Str^R) *endA1* *nupG*.

Las diferentes cepas de *E. coli* se cultivaron en medio LB y YT2X según correspondiera.

IV.2. Medios de Cultivo

IV.2.1 Medio cultivo de *Leuconostoc mesenteroides* (LM):

Reactivos	Concentración g/L
Sacarosa ó glucosa	20
Extracto de levadura	20
K ₂ HPO ₄	20
MgSO ₄ -7H ₂ O	0.2
CaCl ₂ -2H ₂ O	0.5
FeSO ₄	0.01
MnSO ₄ -7H ₂ O	0.01
NaCl	0.01

IV.2.2 Medio Luria-Bertani (LB):

Reactivos	Concentración g/L
Extracto de levadura	5
Peptona de Caseína	10
Cloruro de sodio	10

El medio LB se suplementó con 15 gr/L de agar para preparar medio sólido; como presión selectiva de los cultivos se utilizaron 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ampicilina.

IV.2.3 Medio YT2X:

Reactivos	Concentración g/L
Extracto de levadura	10
Peptona de Caseína	16
Cloruro de sodio	5

IV.2.4 Medio Soc:

Reactivo	Concentración (g/L)
Tristona	20
Extracto de levadura	5
NaCl	10 mM
KCl	2.5 mM
MgCl ₂	10 mM
MgSO ₄	10 mM
Glucosa	20 mM

El medio Soc se utilizó para la recuperación de células *E.coli* después de la electroporación

IV.3 SOLUCIONES

IV.3.1 Extracción de proteínas de cuerpos de inclusión en *E. coli*

Buffer de Lisis

100 mM Tris-Cl, pH 7.0

5 mM EDTA

5 mM DTT* (770mg/L)

*Prepara al instante de usar

Buffer de Lavado 2

5 mM EDTA

5 mM DTT* (770 mg/L)

5 mM Benzamidina-HCl

100 mM Tris-Cl, pH7.0

Buffer de Lavado 1

2% (p/v) Triton 100x

5mM DTT* (770 mg/L)

5mM Benzamidina-HCl

2 M Urea

5mM EDTA

100mM Tris-Cl, pH 7.0

Buffer Extracción

8 M Urea

50 mM Tris-Cl, pH 7.0

0.1 mM NaH₂PO₄

5 mM EDTA

0.01 M Tris-Cl, pH 4.5

8 M Urea o Cloruro de guanidinio.

5 mM DTT*

IV.3.2 Técnica de Elisa

Buffer Bicar: 20 mM NaHCO₃ pH 9.0

Sol. De revelado: 100 mM Na₂HPO₄ pH 5.2

0.4 mg/mL OPD (o-phenilendiamina)

0.4 µl/mL de H₂O₂

Solución Stop: 1N HCl

IV.3.3 Western Blot

Buffer de transferencia.

25 mM Tris pH 8.2

0.1% SDS

192 mM Glicina

20% Metanol.

Buffer de fosfatos (PBS)

137 mM NaCl

2.7 mM KCl

10 mM Na₂HPO₄

1.8 mM KH₂PO₄

Buffer de bloqueo de membrana

PBS con leche descremada al 5%

Buffer de lavado (PBST)

PBS más Tween 20 al 0.05%

Sol. De revelado HRP.

1.6 mg/mL DAB (diaminobencidina)

1.6 µl/mL de H₂O₂

Tris-HCl 50mM pH 7.6

Sol. De revelado TMB (Zymed®)

5 a 10 mL (lista para usarse en inmunoblot)

IV.3.4 Purificación de proteínas por afinidad a columnas de Níquel.

Buffer de lisis* (* pH 8.0)

NaCl 400 mM

Na₂HPO₄ 100mM

Imidazol 10mM

Buffer de lavado 1*

NaCl 400 mM

Na₂HPO₄ 100 mM

Imidazol 30 mM

Buffer de lavado 2*

NaCl 400 mM

Na₂HPO₄ 100 mM

Imidazol 60 mM

Buffer de elusión 1*

NaCl 400 mM

Na₂HPO₄ 100 mM

Imidazol 150 mM

Buffer de elusión 2*

NaCl 400 mM

Na₂HPO₄ 100 mM

Imidazol 300 mM

IV.3.5 Adsorción de anticuerpos contaminantes.

Buffer de fosfatos (PBS)

137 mM NaCl

2.7 mM KCl

10 mM Na₂HPO₄

1.8 mM KH₂PO₄

Buffer de lavado de columna

Tris-HCl 1M pH8.0

IV.4. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

IV.4.1. Purificación del ADN cromosomal de *L. mesenteroides* B512F

Se partió de un cultivo de 5 ml crecido toda la noche con *L. mesenteroides* en el medio de cultivo LM con glucosa previamente descrito. Se utilizó “Ultraclean Microbial DNA Isolation Kit” de Quiagen, siguiendo las especificaciones del fabricante.

IV.4.2. Purificación de plásmidos

La purificación de los plásmidos de las construcciones realizadas se hizo utilizando “High Pure Plasmid Isolation Kit” de Roche siguiendo las instrucciones del fabricante. Se partió de un cultivo de 5 mL crecido toda la noche con *E. coli* DH5 α , adicionado con ampicilina a 100 μ g/mL.

IV.4.3. Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos utilizados (Tabla 4) se sintetizaron en la unidad de síntesis del Instituto de Biotecnología de la UNAM mediante el método del Fosfito-Triéster en fase sólida.

Tabla 4.- Oligonucleótidos utilizados para la amplificación del dominio catalítico de la DsrS y secuenciación de los productos clonados.

Oligonucleótidos	Secuencia (5' → 3')	Longitud	Tm (°C)
Utilizados en la amplificación del “Barril TIM DsrS”			
pThioBarril	ggg-gta-cct-ata-ttg-tca-gtg-tgg-tgg-cca-g	24 amero	73
Barril6His	gct-cta-gag-atg-gtg-atg-gtg-atg-ttt-atc-atc-gtg-tgt-aaa-gc	47 amero	73
Utilizados en la secuenciación de los productos clonados en los vectores de expresión.			
pBadF	gct-gtt-caa-aaa-cgg-tga-agt	21 amero	60
pBADRev	cag-acc-gct-tct-gcg-ttc-tg	20 amero	64
TrxReverse	tgt-aaa-acg-acg-gcc-agt-gc	20 amero	62
p48-interno	ctg-atg-ttg-aaa-ata-gtt-tag-c	22 amero	58

IV.4.4. Amplificaciones por Reacción en Cadena de la Polímerasa (PCR)

Todas las amplificaciones por PCR incluyendo PCR en colonia se realizaron en un equipo “Robo cycler gradient 96” (Stratagene), en un volumen de reacción final de 100 µl. Para la amplificación del “core catalítico” clonado en el vector pThioHis”C” (Invitrogen) se utilizó la enzima “Expand High Fidelity” (Roche®) y para el PCR en colonia se utilizó la enzima “Taq-Polimerasa” (Invitrogen®).

Condiciones de reacción de las amplificaciones:

Enzima “Taq-Polimerasa”	
Reactivos	Concentración
10 x PCR Buffer minus Mg	1X
10 mM c/u dNTPs	0.2 mM
50 mM MgCl ₂	1.5 mM
Primer 5´	0.5 µM
Primer 3´	0.5 µM
Templado	100 ng
Enzima	2.0U
H ₂ O	----

Enzima “Expand High Fidelity”	
Reactivos	Concentración
10x PCR Buffer	1x
10 mM c/u dNTPs	0.4 mM
Primer 5´	0.5 µM
Primer 3´	0.5 µM
Templado	100 ng
Enzima	1U
H ₂ O	----

Condiciones de amplificación para la enzima “Taq Polimerasa”:

No. de ciclos	1 ciclo	35 ciclos	1 ciclo
Desnaturalización	95°C 10 min	95°C 1 min	
Alineamiento		56°C 1 min	
Amplificación		72°C 3 min*	72°C 10 min

Condiciones de amplificación para la enzima “**Expand High Fidelity**”:

No. de ciclos	1 ciclo	35 ciclos	1 ciclo
Desnaturalización	95°C 10 min	95°C 1 min	
Alineamiento		56°C 1 min	
Amplificación		72°C 3 min*	72°C 10 min

Las temperaturas de alineamiento y de extensión pueden diferir entre un PCR y otro dependiendo de la construcción a amplificar, la T_m de los oligonucleótidos utilizados y de la enzima utilizada respectivamente. *El tiempo de amplificación depende del fragmento a amplificar, para lo cual, se consideró 1 min por cada 1000 pb.

IV.4.5. Secuenciación de los productos amplificados

La secuenciación de los productos amplificados se realizó en la unidad de secuenciación del IBT-UNAM mediante el método “Taq FS Dye Terminator Cycle Sequencing Fluorescence-Based Sequencing” en un equipo “Perkin Elmer/Applied Biosystems” modelo 377-18EI.

IV.5. Hibridaciones

Las muestras a hibridar se transfirieron a una membrana de Nylon (Amersham®) y se fijaron, posteriormente la membrana se incubó en una solución de SSC 2X, SDS 1%, Denhardt 1X por espacio de 15min a 65°C. Pasado el tiempo de incubación, se adicionó el ADN-sonda desnaturalizado marcado radiactivamente con 5 µCi de [³²P] dCTP y se incubó 16 hrs a la misma temperatura. Para el marcaje de la sonda se utilizó el “Kit rediprime™ II” de Amersham Pharmacia Biotech UK. Una vez transcurrido el periodo de hibridación se lavó la membrana dos veces con la solución de lavado SSC2X-SDS 0.1% y se colocó en una pantalla de autorradiografía por 12 hrs, al final se reveló utilizando el equipo “Phosphorimager”.

IV. 6. Clonación de los productos de amplificación

El producto de PCR que contenía el “Barril TIM” de la DsrS se clonó en el vector pThioHis”C” de Invitrogene®, para la clonación del producto de PCR se realizaron digestiones del vector y del producto de PCR con las enzimas de restricción KpnI y XbaI (New England Biolabs®). Una vez digeridos y purificados se realizó la ligación empleando la enzima T4 DNA Ligasa (New England Biolabs®) a 16°C por 16 hrs para cada ensayo de clonación se siguió el protocolo de la compañía fabricante. La selección de la clona que contenía el inserto de interés de cada ensayo de clonación se realizó mediante hibridación en colonia, siguiendo las condiciones previamente

descritas y se confirmó mediante digestión con enzimas de restricción y análisis de secuencia.

IV.7 Plásmidos y vectores utilizados en este trabajo

Construcciones utilizadas en este trabajo y sus características principales (Tabla 5).

Tabla 5. Vectores y plásmidos utilizados en este proyecto.

Plásmido	Tamaño (kpb)	Características	Referencia
pBAD/TOPO	4.5	Vector de expresión cuyo promotor <i>ara</i> es inducible por L-arabinosa.	Invitrogen®
pThioHis"C"	4.4	Vector de expresión cuyo promotor <i>lac</i> es inducible por IPTG	Invitrogen®
p48-2	6.0	pBAD/TOPO con el fragmento que codifica para la DSR4 clonado en los sitios <i>Eco</i> RI y <i>Pst</i> I.	Del Moral, 2004
pDXCP	9.0	pBAD/TOPO con el fragmento que codifica para la DSRS clonado en sitios <i>Nco</i> I y <i>Xho</i> I	Olvera Carranza, 2003
ThioDsrSHis	9.0	pBAD/TOPO con el fragmento que codifica para la DsrS fusionada a Tiorredoxina en el N-terminal y una etiqueta de histidinas en el C-terminal	Moulis, 2006
pThioBarrilHis	7.0	pThioHis"C" con el fragmento que codifica para el "Core catalítico" de la DsrS fusionada a Tiorredoxina en el N-terminal y una etiqueta de histidinas en el C-terminal	Este trabajo.

IV. 8. Construcción pThioBarrilHis.

Se decidió analizar el fenómeno proteolítico exclusivamente en el dominio catalítico de la DsrS, por lo cual se realizó la construcción pThioBarrilHis.

Como primer punto se analizó la secuencia aminoacídica de la proteína mediante algoritmos del programa BLAST (Blastpsblast) en la búsqueda de dominios conservados (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) determinando de esta manera la secuencia que corresponde al dominio catalítico de la DsrS (Figura 17).

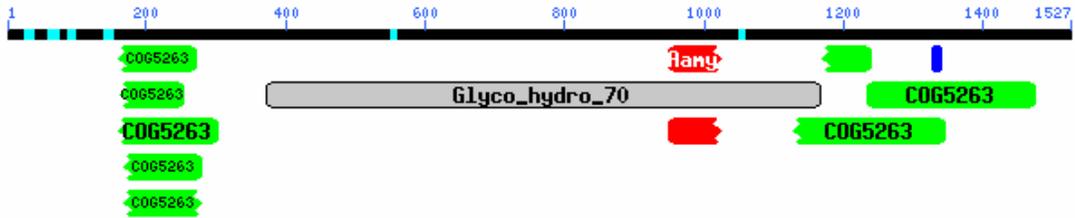


Figura 17. Análisis de la secuencia aminoacídica de la DsrS e identificación del dominio catalítico conservado dentro de la familia 70 de las glicosilhidrolasas.

Una vez que se identificó la secuencia que codifica para el dominio catalítico se diseñaron oligonucleótidos (Barril6His y pThiobarril) para amplificar el producto de 2400 pb a partir de DNA cromosomal de *L. mesenteroides* B512F. El producto amplificado se clonó en el vector de expresión “pThioHis C” inducible por IPTG. Las colonias candidatas se analizaron mediante hibridación en colonia usando como sonda el producto de PCR (Figura 18A) y mediante digestión con enzimas de restricción se identificó la clona positiva con el dominio catalítico (Figura 18B).

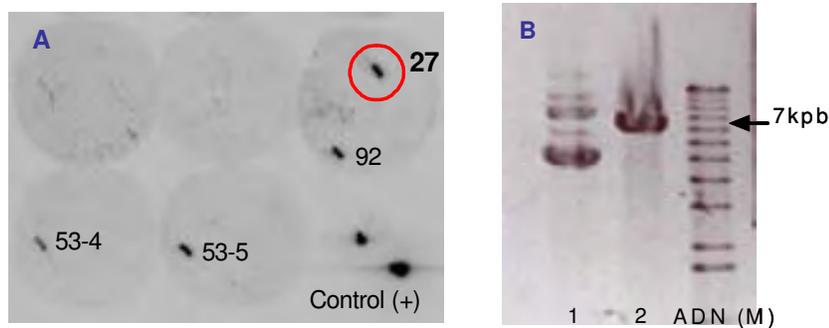


Figura. 18 Identificación de la clona que contiene el gen que expresa el dominio catalítico de la DsrS. A) Hibridación en colonia. B) Digestión con enzimas de restricción y linearización del fragmento de 7 kpb que contiene el gen que expresa el Barril TIM de la DsrS.

IV.9. PRODUCCIÓN DE LA DsrS NATIVA, RECOMBINANTE Y DOMINIO CATALÍTICO DE LA DsrS

IV.9.1 Producción de la Dextranasa de *L. mesenteroides* B512F

El inóculo para las fermentaciones se preparó a partir de células almacenadas en glicerol 30% (v/v) a -20°C en matraces de 250 mL y 1000 mL de volumen nominal y volumen de trabajo de 50 y 200 mL de medio de cultivo LM con sacarosa antes mencionado, guardando una relación 5:1, respectivamente. Los cultivos se inocularon al 10% (v/v).

El crecimiento celular se monitoreó midiendo la densidad óptica a 600 nm en un

espectrofotómetro Beckman modelo DU® 650. La fermentación se detuvo cuando el cultivo mostraba entre 7 y 8 U de DO_{600nm} y/o pH 5.2. Posteriormente, las células se separaron del sobrenadante por centrifugación (10000 rpm durante 20 min. a 4°C). El sobrenadante conteniendo las enzimas se recuperó y se ajustó el pH a 5.2 con soluciones de ácido acético.

El sobrenadante se concentró 20 veces con el sistema de ultrafiltración de fibras huecas Amicon® utilizando una membrana de corte de 10 kDa. Posteriormente se dializó durante una noche en presencia de amortiguador de acetatos 20 mM pH 5.2.

IV.9.2. Expresión de la proteína DsrS recombinante

Se inocularon 5 ml de medio YT2X-Ampicilina 100 µg/mL con la clona ThioDsrSHis la cual se incubó a 30°C/200 rpm toda la noche. Se tomaron 2.5 mL del cultivo anterior y se inocularon 50 mL de medio YT2X fresco, se dejó en incubación a 30°C/200 rpm toda la noche. Al término del cultivo se tomaron 50 mL del mismo con los cuales se inocularon 950 mL de medio fresco YT2X-Ampicilina 100 µg/mL y como inductor arabinosa a una concentración final de 0.002%, incubándose a 22°C y 200 rpm por un lapso de 16 H o hasta alcanzar una $DO_{600nm} > 1.0$. Al término del cultivo se colectó el paquete celular por centrifugación a 6000 rpm 5 min y se lavó dos veces con solución amortiguadora de acetatos 20 mM pH 5.2. Posteriormente, se resuspendió en 5 mL de la solución anterior suplementada con Tritón(80) al 1 %, ésta muestra se prensó a 19000 psi en Prensa de French y se centrifugó 30 min a 10,000 rpm a 4°C, separándose el sobrenadante del resto celular. Las muestras se mantuvieron a 4°C hasta ser procesadas.

IV.9.3. Expresión del dominio catalítico de la DsrS

Una vez que se obtuvo la clona positiva se realizó el perfil de expresión usando IPTG como inductor. Se inocularon 10 mL de medio LB-Ampicilina 100 µg/mL con la clona BarrilHis los cuales se incubaron a 37°C toda la noche. Al término del cultivo se tomaron 50 mL del mismo con los cuales se inoculó 1 L de medio fresco YT2X, se agregó IPTG como inductor a una concentración final de 0.1 mM y se incubó a 30°C. Al analizar el perfil de expresión se determinó que el tiempo de fermentación óptimo es a las 4 hrs. después de agregar el inductor. Esta proteína de 95 kDa se expresó en cuerpos de inclusión, con la finalidad de expresarla en la fracción soluble se modificaron las condiciones de fermentación. Una vez teniendo el preinóculo se inoculó 1 lt de medio fresco YT2X, se agregó IPTG como inductor a una concentración final de 0.1 mM y se incubó por 16 H a 18°C. Al terminó del cultivo se colectó el paquete celular por

centrifugación a 4000 rpm 15 min y se lavó dos veces con solución amortiguadora de acetatos 20 mM pH 5.2. Posteriormente, se resuspendió en 5 mL de la solución anterior suplementada con Tritón(80) al 1 %, ésta muestra se prensó a 900 psi con la Prensa de French y se centrifugó 30 min a 10,000 rpm y 4°C, se separó el sobrenadante del resto celular. Las muestras se mantuvieron a 4°C hasta ser procesadas.

IV.9.4 ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS

Las proteínas se separaron por electroforesis en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS) siguiendo la metodología de Laemmli (1970). Se utilizó una cámara Mighty small I, con geles de 1 mm de espesor. El gel concentrador se realizó al 4% y el de separación al 6% de poliacrilamida, los pesos moleculares a separar en esta concentración se encuentra en el rango de 50 a 200 kDa. Las muestras a analizar se trataron a ebullición por 5 min con una solución de carga desnaturalizante que contiene: Tris-HCl 0.12M pH 6.8, SDS 4% (w/v), glicerol 20% (v/v), β -mercaptoetanol 10% (v/v), y azul de bromofenol 0.05% (w/v). La migración se efectuó a corriente constante de 20 - 50 mA. La solución amortiguadora empleada para la electroforesis contiene Tris-base 15.1 g/L, glicina 72 g/L, SDS 5 g/L. Posterior a la migración, el gel podía seguir uno de los siguientes tratamientos:

- **Coloración de proteínas con azul de coomasie:** el gel se incubó durante una noche (O/N), en una solución de ácido acético 10% (v/v), metanol 30% (v/v) y azul de coomasie 0.2% (v/v). Posteriormente, se efectuaron lavados del gel para eliminar los excesos del colorante con solución desteñidora I (ácido acético 10% v/v y metanol 50% v/v) y solución desteñidora II (ácido acético 7% v/v y metanol 5% v/v).
- **Zimograma y Coloración con reactivo de Schiff:** el gel se lavó a temperatura ambiente 3 veces durante 20 min con una solución renaturalizante que contiene: amortiguador de acetatos 20 mM pH 5.2 y Tween 80 al 1% (v/v). Posteriormente, el gel se incubó durante toda la noche a temperatura ambiente con esa misma solución adicionada con sacarosa 100 g/L. La aparición de bandas blancas correspondieron a la síntesis de polímero producido por las GTFs. Las bandas de polímero son fijadas con una solución de etanol al 75% (v/v) durante 30 min. Posteriormente el gel permaneció 1 h en una solución de ácido periódico 0.7% (p/v) y ácido acético 5% (v/v). Después, se efectuaron 3 lavados sucesivos de 20 min con metabisulfito de sodio 0.2% (p/v) y ácido acético 5% (v/v). Finalmente el gel se puso en contacto con el reactivo de Schiff (Sigma) hasta alcanzar la coloración deseada.

IV.9.5. Determinación de la actividad enzimática de la DsrS

La determinación de la actividad enzimática (enzima nativa y recombinante) se realizó cuantificando azúcares reductores liberados mediante el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) descrito por Sumner y Howell (1935) en un medio de reacción que contenía 10 % de sacarosa, solución acetatos 20 mM pH 5.2 a 30°C y la enzima. Una unidad de actividad dextransacarasa se reporta como la cantidad de enzima que libera una μmol de D-fructosa/min.

IV.9.6. Cuantificación de proteínas

La cuantificación de la proteína se realizó por el método Bradford mediante el kit Bio-Rad (Hércules, CA) y se utilizó albúmina sérica bovina (Fracción V, SIGMA) como estándar.

IV.9.7 Relación la actividad Hidrólisis/Transferencia de la DsrS mediante HPLC.

Con el fin de determinar cuanta glucosa se usa para la síntesis de polímero (actividad transferasa) y cuanta se libera (actividad hidrolítica) se cuantificó la cantidad de glucosa y fructosa por HPLC. En todos los casos se tomó 1U/mL de DsrS y se incubó a 30°C durante 24 h. en presencia de sacarosa al 10%. Al terminó de la reacción la enzima se desactivó por ebullición durante 10 min, se centrifugó el tubo y se separó el sobrenadante.

La muestra se diluyó 1:10 en agua destilada y se analizó mediante HPLC, utilizando como estándares glucosa, fructosa y sacarosa.

La corrida se realizó en HPLC (Waters 510) utilizando una columna Prevail Carbohydrate ES column (Part. No. 35101 Alltech) con un detector de índice de refracción (Waters 410), bajo las siguientes condiciones: temperatura ambiente, fase móvil Acetonitrilo:Agua (68:32 v/v) con un flujo de 1 mL/min.

La cantidad de fructosa libre equivale a la hidrólisis mientras que la diferencia (glucosa-fructosa) equivale a la transferencia.

IV.10. ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS

Los análisis de comparación de secuencias (Blast) se realizaron utilizando los algoritmos (Software) “Translated query-Protein db (blastx)”, “Nucleotide-nucleotide BLAST (blastn)” y “Protein-protein BLAST (blastp)” del National Center for Biotechnology Information U.S. National Library of Medicine 8600 Rockville Pike, Bethesda, MD 20894. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)

IV.11 PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES ANTI-DsrS

IV.11.1 Expresión de la proteína DsrS4 (Antígeno)

La producción de anticuerpos policlonaes Anti-DsrS se realizó de acuerdo a la estrategia experimental IV.1, utilizando como antígeno (Ag) o inmunógeno la proteína DsrS4 (Del Moral, 2004) que se deriva del plásmido p48-2 (Figura 19), la cual corresponde a una fracción del dominio catalítico (barril TIM) de la dextranasa de *L. mesenteroides* B512F.

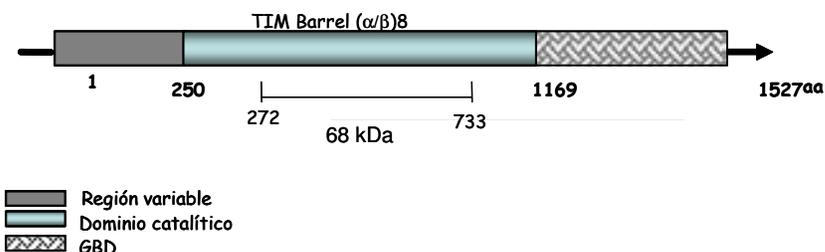


Figura 19. Ubicación de la proteína DsrS4, empleada como inmunógeno en la producción de anticuerpos Anti-DsrS, en la proteína DsrS.

Se inocularon 10 ml de medio LB-Ampicilina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con la clona p48-2 los cuales se incubaron a 37°C durante toda la noche. Al término del cultivo se tomaron 6 mL del mismo con los cuales se inocularon 600 mL de medio fresco y se incubó a 37°C hasta alcanzar una $\text{DO}_{550\text{nm}}$ 0.5-0.6. En este momento, se agregó arabinosa (inductor de la expresión del gene *dsrS*) a una concentración final de 0.002% y se incubó por cuatro horas más a 37°C. Al término del cultivo se colectó el paquete celular por centrifugación a 6000 rpm 5 min y se lavó dos veces con solución amortiguadora de acetatos 20 mM pH 5.2.

IV.11.2 Preparación y extracción de la proteínas insoluble DsrS4 (cuerpos de inclusión) de *E. coli*.

La proteína DsrS4 se expresó como cuerpos de inclusión lo que permitió su extracción y purificación mediante la técnica establecida por Coligan y col. (2004) descrita a continuación. La pastilla celular se pesó y se resuspendió en buffer de lisis (4-6 mL por cada gramo de pellet). Las células se rompieron utilizando la Prensa de French a 19000 psi de presión y se centrifugó a 18500g/4°C/30 min descartando el sobrenadante. Enseguida se resuspendió la pastilla en el buffer de lavado 1 (4-6 mL/gr de pellet) y se centrifugó nuevamente a 18500 g/4°C/30 min, se descartó el sobrenadante y se repitió el paso anterior 2 veces más. Después de los lavados se resuspendió la pastilla en buffer de lavado 2 (4-6 mL/gr de pastilla) y se centrifugó a 18500 g/4°C/30 min descartando el sobrenadante. Enseguida se resuspendió el pellet en buffer de extracción (0.5 a 1.0 mL/gr de pellet) y se centrifugó a 18500 g/4°C/45 min y recuperando el

sobrenadante pues es en esta fracción en donde se encuentra la proteína.

IV.11.3 Cuantificación de la proteína DsrS4

La cuantificación de la proteína se realizó mediante densitometría. Las imágenes se capturaron utilizando un fotodocumentador Tagle Eye II marca Stratagene y se analizaron mediante el software LabWorks, usando como estándares concentraciones conocidas de BSA.

IV.11.4 Inmunización a conejos

Previo a la inmunización se determinó la pureza de la proteína DsrS4 mediante análisis SDS-PAGE de doble dimensión (Figura 20), encontrándose que no contenía formas contaminantes.

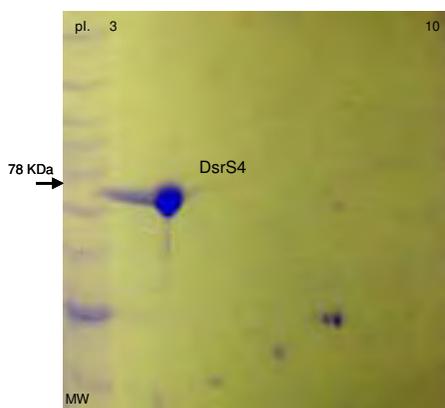


Figura 20. Análisis de la proteína DsrS4 mediante SDS-PAGE de doble dimensión. Podemos observar que no existen proteínas contaminantes en el mismo peso molécula que la proteína empleada como inmunógeno.

Para la producción de anticuerpos Anti-DsrS se seleccionaron conejos New Zeland hembras de 1 años de edad. Una vez cuantificada la proteína se inmunizó al animal con 1 mg de proteína vía subcutánea de acuerdo a la técnica establecida por Coligan y col. (2004) en *Currents and Protocols in Protein Science* descrita a continuación. Para la primer inmunización se empleó adyuvante de Freud (adyuvante completo) y en las inmunizaciones posteriores se empleó hidróxido de aluminio como adyuvante incompleto. Los períodos de inmunización fueron de una semana entre el primer y segundo inóculo y con espacios de 15 días para los inóculos posteriores hasta llegar a un total de 5 inmunizaciones. En cada una de las inmunizaciones se tomó una muestra de sangre del animal para determinar el título de anticuerpos en el suero.

IV.11.5 Titulación de anticuerpos y EC_{50}

Una vez terminado el esquema de inmunización se procedió a la titulación de los anticuerpos mediante la técnica de ELISA (Figura 21), establecida por Coligan y col. (2004) en *Currents and*

Protocols in Protein Science, con la finalidad de analizar la respuesta inmune y a su vez, el avance en la producción de anticuerpos.

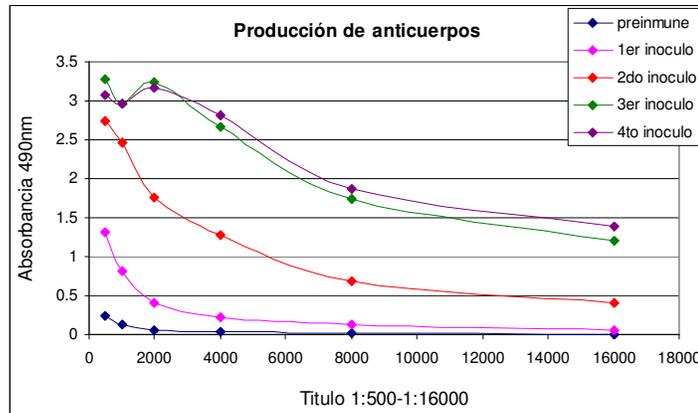


Figura 21. Esquema de producción de anticuerpos Anti-DsrS, en el que puede observarse un título de anticuerpos similar entre el 3er y cuarto inoculo.

Al observarse una estabilidad en la respuesta inmune, esto es, cuando no existen cambios en el título de anticuerpos entre las dos últimas inmunizaciones se procedió a sangrar al animal a blanco recolectando en su totalidad la sangre del animal. Una vez recolectada la sangre esta se centrifugó a 2500 rpm durante 15 min con la finalidad de separar el paquete globular del suero, recolectando esta ultima fracción ya que es en la cual se localizan los anticuerpos. Las muestras de suero, conteniendo los anticuerpos, se alicuotaron y se almacenaron a -20°C

Con la finalidad de determinar el avance y capacidad de respuesta inmunológica del animal. A la par de la titulación de anticuerpos, se realizó el análisis EC₅₀ para determinar el título de anticuerpos del animal capaces de detectar el 50% del antígeno (Figura 22).

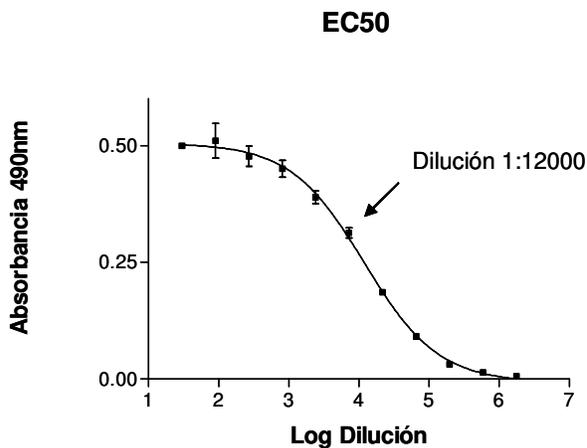


Figura 22. Gráfica de dosis-respuesta, para definir el valor EC₅₀ para el anticuerpo Anti-DsrS, usando como antígeno la DsrS4.

Para determinar la dilución ideal de anticuerpo que detecta la proteína en membrana, se realizó la titulación de anticuerpos mediante la técnica de Western Blot usando como control la proteína DsrS4 (Figura 23).

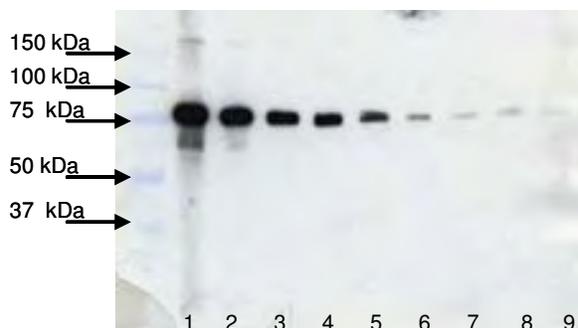


Figura 23. Titulación de anticuerpos Anti-DsrS de conejo usando como antígeno la proteína DsrS4, mediante Western Blot

1. Dilución 1:500
2. Dilución 1:1000
3. Dilución 1:2000
4. Dilución 1:4000
5. Dilución 1:8000
6. Dilución 1:16000
7. Dilución 1:32000
8. Dilución 1:64000
9. Suero Preimmune.

IV.11.5.1 Técnica de ELISA

Para determinar el título de anticuerpos a utilizar en los ensayos posteriores se empleó la técnica de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). Se activó la placa de ELISA con 5µg de la proteína DsrS4 y DsrS, según el caso, en cada uno de los pozos almacenando la placa a 4°C durante toda la noche. Pasado este tiempo se lavó la placa 3 veces con PBS y se bloqueó con PBS con leche descremada al 1% se incubó a 37°C por 2 horas.

Terminado el bloqueo se lavó la placa 3 veces con PBS y se agregó el anticuerpo primario (Anti-DsrS) en diluciones seriadas de 1:500 hasta 1:32000, incubándose a 37°C por 2 horas. Pasado el tiempo se lavó 3 veces con PBST, seguido de 3 lavados con PBS. Una vez terminados los lavados se agregó el anticuerpo secundario (Anti-conejo-HRP) en una dilución 1:5000 y se incubó por 1 hora a 37°C. Pasado este tiempo se lavó 3 veces con PBST, seguido de 3 lavados con PBS y se agregó la solución de revelado (0.4 mg de OPD/ml de buffer Na₂HPO₄ 0.1M pH 5.0 adicionado con 0.4µl de H₂O₂ por ml de solución) esperando al desarrollo de color.

La reacción se detuvo adicionando HCl 1N, y se leyó la placa de Elisa en el lector VersaMax a una λ de 490nm. La reacción es estable en un periodo no mayor a 30 min.

Para determinar la dilución que identificara a más del 50% de los antígenos (EC50) se realizó la técnica de ELISA ya descrita, utilizando como antígeno la proteína DsrS4, analizando los anticuerpos Anti-DsrS por cuadruplicado en diluciones seriadas de 1:30 hasta 1:1771470. La determinación de EC50 se realizó mediante análisis estadístico de los resultados utilizando el programa Prism 3.0

IV.12. ADSORCIÓN DE ANTICUERPOS CONTAMINANTES.

Con la finalidad de eliminar la unión inespecífica de aquellos anticuerpos producidos contra las proteínas de *E. coli* (anticuerpos contaminantes) se procedió a la adsorción de estos anticuerpos en una matriz (columna de sepharosa activada con bromuro de cianógeno).

Para limpiar los anticuerpos utilizamos un extracto de proteínas de *E. coli* las cuales se van a unir a la columna de Sepharosa y bromuro de cianógeno mediante interacción de los grupos aminos libres y las proteínas del extracto. Para asegurar la interacción de las proteínas de *E. coli* con la matriz se ajustó el pH del extracto de proteínas hasta un pH de 9.0 utilizando bicarbonato de sodio y NaOH. Con la finalidad de hidratar la matriz y no afectar los grupos reactivos se agregan a ésta 3.5 mL de HCl 1mM.

Una vez hidratada la matriz y ajustado el pH del extracto se colocan en un mismo tubo y se dejan recircular a temperatura ambiente durante toda la noche. Este paso va a asegurar la interacción y unión de las proteínas de *E. coli* y los grupos amino de la matriz.

Una vez pasado este tiempo se centrifugó a 3500 rpm/4°C/15 min. Y se colocó en un soporte con la finalidad de empaquetar la matriz. De manera alterna se diluyen los anticuerpos 1:1 en PBS. Una vez empaquetada la matriz, procedemos a pasar lentamente a través de ella los anticuerpos diluidos. En este caso la parte colectada corresponde a los anticuerpos Anti-DsrS, limpios de anticuerpos contra *E. coli* (Anticuerpos contaminantes). Terminado este paso se procede a limpiar la columna utilizando una solución de Tris-HCl 0.1M pH8.0. El título de anticuerpos y la pureza de estos se determinó mediante la técnica de western blot descrita a continuación, encontrando el título de 1:500 como el más favorable para nuestros ensayos (Figura 24).

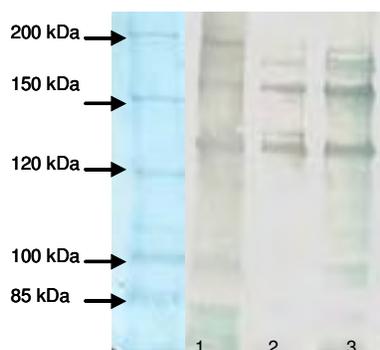


Figura 24. Análisis de la adsorción de anticuerpos contaminantes y titulación de Anticuerpos Anti-DsrS mediante western Blot utilizando como antígeno la DsrS recombinante. 1) Anti-DsrS antes de la adsorción. 2) Anti-DsrS adsorbidos dilución 1:1000. 3) Anti-DsrS adsorbidos dilución 1:500. Se observa que el carril 3 (1:500) muestra menor fondo en el ensayo y una mejor definición de las formas activas y no activas derivadas de la proteólisis de la DsrS.

IV. 13 ENSAYOS DE WESTERN BLOT

Se realizó electroforesis de proteínas utilizando 50 µg de está de acuerdo a la técnica ya descrita, después de la electroforesis las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Amersham) y se procedió a realizar la técnica de Western Blot.

Los anticuerpos primarios utilizados son:

- Anti-HisTagHRP (Qiagen)
- Anti-Thioredoxine* (Invitrogen)
- Anti-DsrS*

* Es necesario el empleo de anticuerpos secundarios que permitan identificar de manera indirecta el antígeno.

Los anticuerpos secundarios utilizados son:

- Anti-Ratón (Amersham)
- Anti-Conejo (Amersham)

Western Blot

Una vez realizada la transferencia de las proteínas a la membrana de nitrocelulosa se realizó una lavado de la membrana con PBS durante 5 min y se procedió a bloquear la membrana con una solución de PBS + leche descremada al 5% durante 1 H, en agitación a temperatura ambiente. Posteriormente se realizaron 2 lavados de 10 min con PBS. Al termino de los lavados se procedió a incubar la membrana con el anticuerpo primario (Tabla 6) durante 2 hr a temperatura ambiente*, realizándose posteriormente 3 lavados de 15 min cada uno con PBST. Terminado esto se procedió a incubar la membrana con el anticuerpo secundario** (Tabla 6) durante 1 hr a temperatura ambiente*. Pasado el tiempo se realizaron 3 lavados de 15 min. con PBST y 2 lavados de 10 min cada uno con PBS (para eliminar el detergente). Una vez concluido esto se procedió al revelado de la membrana. Como el anticuerpo secundario esta acoplado a HRP se usó como sustrato DAB o TMB (Zymed®). Una vez terminado el revelado se lavó la membrana con agua destilada para eliminar el exceso de sustrato.

*El anticuerpo primario y/o secundario pueden dejarse incubando a 4°C durante toda la noche y continuar la técnica ya descrita.

Tabla 6. Anticuerpos utilizados en los ensayos de Western Blot.

Anticuerpo.	Tipo de anticuerpo.	Dilución utilizada.	Referencia.
Anti-HisTag HRP	Primario acoplado a la enzima HRP	1:5000	Qiagen®
Anti-Tioredoxina	Primario (IgG de Ratón)	1:5000	Invitrogen®
Anti-Ratón	Secundario acoplado a la enzima HRP	1:5000	Amersham®
Anti-DsrS	Primario (IgG de conejo)	1:500	Este trabajo.
Anti-Conejo	Secundario acoplado a la enzima HRP	1:2000	Amersham®

IV.14 ENSAYOS CON INHIBIDORES DE PROTEASAS.

Para determinar el efecto de los inhibidores de proteasas en la proteólisis de la DsrS se empleó un cóctel de inhibidores de proteasas denominado Complete (Roche®), el cual, inhibe metalo, serino y cisteinproteasas) y Pepstatina (Roche®) inhibidor de aspártico proteasas, Complete se empleó adicionando una tableta del cóctel de inhibidores por cada 50 mL de medio de cultivo o buffer de suspensión según sea el caso y la Pepstatina se adicionó en una concentración final de 0.7 µg/mL de solución.

Se realizaron también ensayos con inhibidores de proteasas variando el pH del buffer de suspensión de la proteína, en condiciones de pH 4.8, 5.2 y 6.8.

IV.15 PURIFICACIÓN DE LA DsrS RECOMBINANTE POR COLUMNA DE AFINIDAD A NIQUEL.

La enzima DsrS recombinante se purificó empleando la resina Ni-NTA Superflow de Qiagen®, mediante cromatografía de afinidad. Esta afinidad se da entre el Níquel en la resina y las histidinas localizadas en el C-terminal de la enzima.

La purificación de la proteína se realizó mediante condiciones no desnaturizantes (nativas) de acuerdo a las especificaciones de la casa comercial. Utilizando las siguientes condiciones:

- Buffer de lisis. Para equilibrar la resina y diluir nuestro extracto proteico.
- Buffer de lavado 1 y 2 (3 lavados de 1 mL con cada buffer)
- Buffer de elusión 1 y 2 (3 lavados de 1 mL con cada buffer)

IV.16. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS EN GELES DE DOBLE DIMENSIÓN.

IV.16.1 Cuantificación de la proteína.

La proteína se cuantificó usando 2D-Quant kit de Amersham®. Siguiendo las indicaciones de la casa comercial.

IV.16.2 Isoelectroenfoque.

Para realizar la separación en primera dimensión (Isoelectroenfoque) se utilizaron las tiras de separación IPG strip pH 3-10 de 7 cm (Amersham®). Cada tira tiene una capacidad de 100 mg de proteína. El tratamiento de la muestra y carga en las tiras de isoelectroenfoque se realizó de acuerdo a las especificaciones de la casa comercial. Una vez preparada la muestra se procede a la hidratación de las tiras de isoelectroenfoque con la muestra, para lo cual se deja en contacto la muestra con la tira, una vez realizado este paso se coloca aceite mineral sobre la tira, la cual se deja hidratando durante 16 hrs o toda la noche a temperatura ambiente.

Una vez terminado el paso de hidratación se procede al isoelectroenfoque para lo cual se empleó el equipo Ettan IPGphor Isoelectric Focusing System (Amersham®) parámetros definidos de acuerdo a las especificaciones de la casa comercial (24).

Una vez realizado el isoelectroenfoque y previo a la segunda separación* se procedió a equilibrar la tira con una solución equilibrante que contiene: 2% SDS, 50mM Tris-HCl pH 8.8, 6M Urea, 30% (v/v) glicerol, 0.002% de azul de bromofenol y 100 mg de DTT/mL de solución, durante 15 min. Pasado este tiempo se equilibra la tira nuevamente con una solución que contiene: 2% SDS, 50mM Tris-HCl pH 8.8, 6M Urea, 30% (v/v) glicerol, 0.002% de azul de bromofenol y 250 mg de iodoacetamida por mililitro de solución, durante 15 min.

IV.16.3 Electroforesis de proteínas en segunda dimensión (2D)

Las proteínas se separaron por electroforesis en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes en presencia SDS siguiendo la metodología de Laemmli (1970). Se utilizó una cámara Mighty small I, con geles de 1 mm de espesor. Para la separación se utilizó un gel al 6% de poliacrilamida. Se colocó la tira del isoelectroenfoque y se selló el gel con una solución que contiene 0.5% de agarosa, 0.002% de azul de bromofenol en solución amortiguadora de electroforesis de proteínas. La migración se efectuó a corriente constante de 15 mA. La solución amortiguadora empleada para la electroforesis contiene Tris-base 15.1 g/L, glicina 72 g/L, SDS 5 g/L. Posterior a la migración, el gel podía seguir uno de los siguientes tratamientos ya descritos:

- Coloración de proteínas con azul de coomasie.

-
- Zimograma y Coloración con reactivo de Schiff.
 - Análisis de Western Blot (Anti-His, Anti-Thiorredoxina y/o Anti-DsrS).

IV.17 PURIFICACIÓN DE LAS FORMAS DE 170 Y 155 kDa (FRACCIÓN TDH1) MEDIANTE ELECTROELUSIÓN.

Para determinar la naturaleza del fenómeno proteolítico que sufre la DsrS recombinante es necesario purificar la forma enzimática precursora (200 kDa).

La fracción TDH1 se sometió a SDS-PAGE al 6%, la migración se realizó a 20mA. Una vez separadas las proteínas se tiñeron con azul de coomassie. Las formas de 170 y 150 kDa fueron cortadas del gel y colocadas en buffer de corrida.

La electroelusión se realizó utilizando tubos elutatubos (Fermentas®), colocando la fracción de gen conteniendo las proteínas dentro del tubo y llenando con buffer para electroforesis de proteínas. La electroelusión se realizó a temperatura de 4 °C, a 30 mA durante toda la noche.

Una vez pasado el tiempo de electroelusión, se colectó el contenido del tubo elutatub y la proteína se recuperó por concentración utilizando tubos millipore con filtro de corte de 100 kDa siguiendo las especificaciones de la casa comercial.

Las proteínas se analizaron al momento de la extracción y se almacenaron bajo las condiciones previamente descritas en las estrategias experimentales.

V. RESULTADOS

V. 1. Estudio del procesamiento proteolítico en la dextranasa (DsrS) de *Leuconostoc mesenteroides* B512F

En estudios previos acerca de la proteólisis de la DsrS de *Leuconostoc mesenteroides* B512F, Sánchez y col. (1999) mediante análisis de zimogramas, observaron tres bandas con actividad dextranasa (170, 155 y 120 kDa) producto de la degradación proteolítica de la enzima concentrada del sobrenadante de fermentación. Así mismo, determinaron que el tiempo, pH y temperatura de almacenamiento afectan el procesamiento proteolítico de la enzima nativa. Con base en este reporte se decidió explorar el efecto de estos factores en el procesamiento proteolítico de la DsrS nativa, utilizando como principal herramienta anticuerpos específicos hacia la proteína (Anti-DsrS), los cuales a diferencia de los ensayos de actividad, podrían detectar, además de las formas de la DsrS activas, las formas proteolizadas inactivas de la enzima generadas por este fenómeno.

Para lo anterior se concentró por ultrafiltración la DsrS nativa del sobrenadante de fermentación y se almacenó a dos temperaturas: 4°C (en la cual el fenómeno proteolítico se lleva a cabo de forma limitada) y temperatura ambiente (donde la velocidad del procesamiento proteolítico se incrementa); y a dos valores de pH: 5.2 (el óptimo para la actividad enzimática) y 8.0 (el cual de acuerdo con Sánchez y col. (1999) favorece el procesamiento proteolítico). Así mismo, estas muestras fueron incubadas en presencia y ausencia de los inhibidores de proteasas Complete (coctél de inhibidores de metalo, serino y cistein proteasas) y Pepstatina (inhibidor de aspártico proteasas). La evaluación de procesamiento proteolítico de las muestras se realizó mediante análisis de SDS-PAGE, zimogramas, Western Blot (Anti-DsrS) y actividad enzimática (Estrategia experimental IV.2). El monitoreo del procesamiento proteolítico de las muestras almacenadas a 4°C se realizó durante 150 días de incubación, tiempo durante el cual la enzima aún es activa no obstante su degradación proteolítica.

El análisis de Western Blot Anti-DsrS de la enzima almacenada a pH 5.2 (Figura 25) muestra que la enzima se procesa en ausencia y en presencia de inhibidores de proteasas ya que se observaron bandas múltiples después de 120 y 150 días de almacenamiento. Sin embargo, se observó que la velocidad de este procesamiento es retardada en presencia de dichos inhibidores.

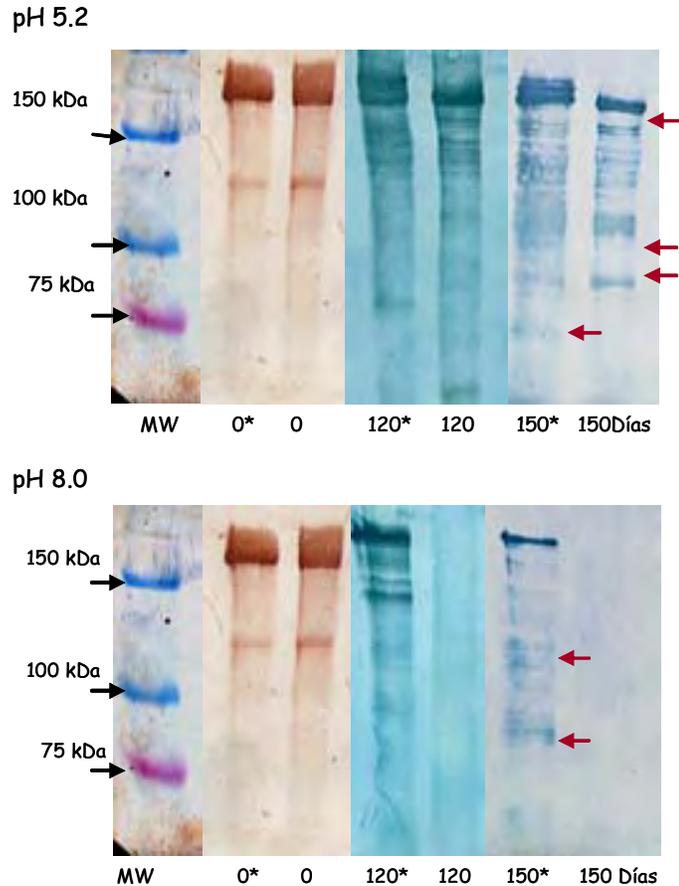


Figura 25. Efecto del pH, uso de inhibidores de proteasas y tiempo de almacenamiento a 4°C, en el procesamiento proteolítico de la DsrS de *Leuconostoc mesenteroides* B512F, mediante análisis de Western Blot utilizando anticuerpos Anti-DsrS. (*) Muestra almacenada en presencia de los inhibidores de proteasas complete y pepstatina.

Por otro lado, en las muestras almacenadas a pH 8.0 sin inhibidores de proteasas no se observó señal correspondiente a proteína, sugiriendo que el grado de proteólisis en esta enzima es total a los 120 días de incubación. Por el contrario, en la muestra almacenada al mismo pH en presencia de inhibidores de proteasas, a los 120 y 150 días aún se identifican bandas de alto peso molecular (proteína de 170 kDa), no obstante el avanzado grado de proteólisis sufrido por la enzima.

Todas las muestras almacenadas a 4°C presentaron una pérdida del 30% de la actividad enzimática a los 5 días de almacenamiento seguido de una ligera pérdida de actividad hasta estabilizarse en 60% de actividad residual (Figura 26). Con el fin de analizar si las formas estables alcanzadas después de varios días de almacenamiento modificaban la especificidad de la enzima, se determinó la relación Hidrólisis/Transferencia de las muestras almacenadas, las que efectivamente mostraron un cambio en la especificidad enzimática, perdieron su actividad transferasa e incrementaron su actividad hidrolítica (datos no mostrados).

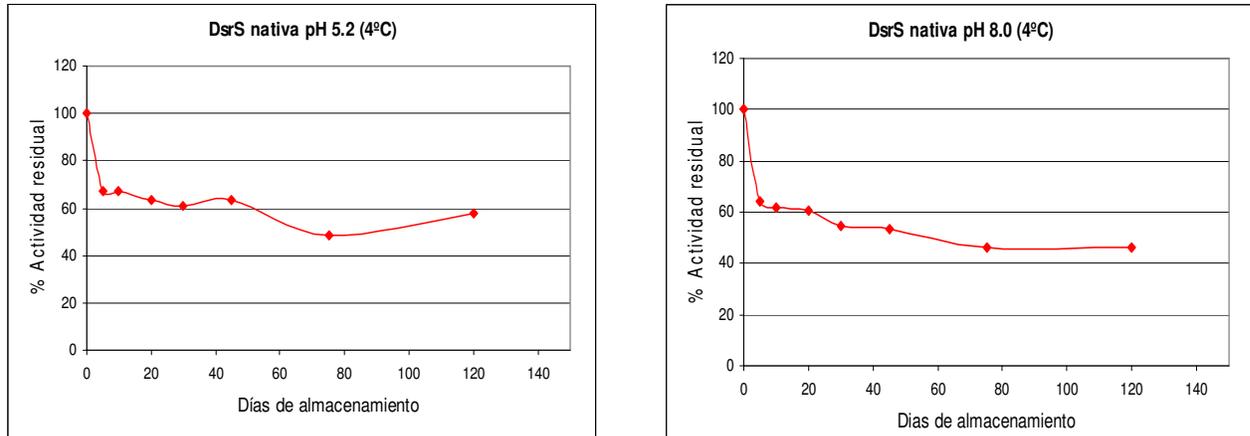


Figura 26. Efecto de las condiciones de almacenamiento en la actividad de la DsrS nativa, almacenada sin inhibidores de proteasas a diferentes valores de pH. La determinación de la actividad enzimática se realizó a pH 5.2.

En los ensayos con la enzima nativa almacenada a temperatura ambiente se observó una mayor velocidad de procesamiento proteolítico comparado con el observado al almacenar la enzima a 4°C, por lo que el período de monitoreo fue de sólo 6 días (Figura 27).

Se observó un incremento de estas proteolizadas, en un rango de 80 a 120 kDa, en el extracto sin inhibidores de proteasas de la enzima almacenada a pH 5.2 (Figura 27). Una diferencia marcada se obtuvo en los extractos almacenados a pH 8.0 con y sin inhibidores de proteasas en donde se observa un mayor número de formas derivadas de la proteólisis a los dos días de incubación, corroborando que a valores de pH alcalino la actividad proteolítica presente en los extractos se incrementa (Sánchez y col. 1999). El análisis de las muestras almacenadas a pH 8.0 se continuó hasta los 6 días, después de los cuales ya no se pudieron identificar formas derivadas del procesamiento, probablemente debido a la degradación completa de la enzima.

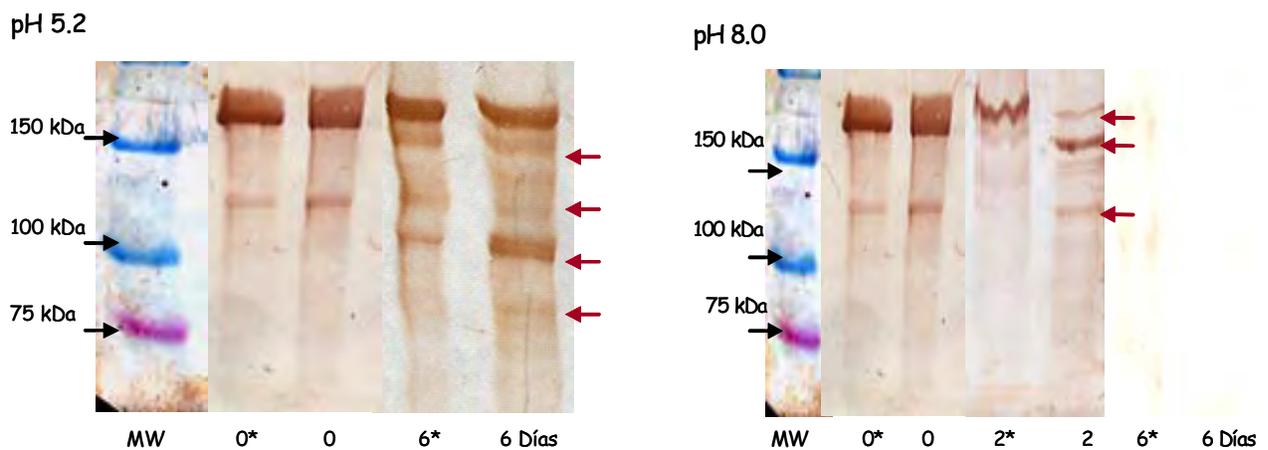


Figura 27. Efecto del pH, uso de inhibidores de proteasas y tiempo de almacenamiento a temperatura ambiente, en el procesamiento proteolítico de la DsrS de *Leuconostoc mesenteroides* B512F, mediante análisis de Western Blot utilizando anticuerpos Anti-DsrS. (*) Muestra almacenada en presencia de los inhibidores de proteasas complete y pepstatina.

Al monitorear la actividad enzimática observamos un fenómeno similar al encontrado en la enzima almacenada a 4°C (pH 5.2), ya que se observó una caída del 60% en la actividad al primer día de almacenamiento sin inhibidores de proteasas, seguida de una pérdida paulatina hasta llegar al 80% de pérdida de la actividad. Esto puede dar lugar en ambas muestras a un cambio en la especificidad de la actividad enzimática, como consecuencia del fenómeno proteolítico (Figura 28).

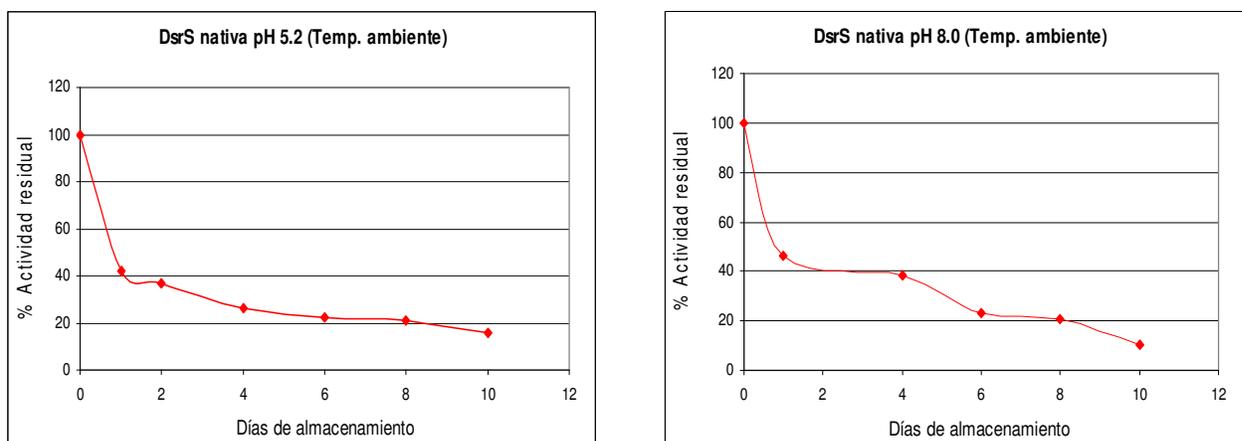


Figura 28. Efecto de las condiciones de almacenamiento en la actividad de la DsrS nativa, almacenada sin inhibidores de proteasas a diferentes valores de pH. La determinación de la actividad enzimática se realizó a pH 5.2.

Como ya se señaló, se observó un cambio de especificidad de la enzima, al determinar la relación Hidrólisis/Transferencia, las muestras almacenadas a pH 5.2 presentan un incremento de la actividad hidrolasa y una pérdida de la actividad transferasa. Sin embargo, en las muestras almacenadas a pH 8.0 el cambio de especificidad fue total después de un día de almacenamiento, ya que se perdió completamente la actividad transferasa, convirtiéndose en una enzima totalmente hidrolítica (datos no mostrados).

En general estos resultados muestran que al almacenar la enzima a temperatura ambiente, en ausencia de inhibidores de proteasas y pH 8.0 se observa un rápido procesamiento proteolítico de la DsrS nativa. De manera inversa, al almacenar la enzima a 4°C a pH 5.2 y en presencia de inhibidores de proteasas se logra una mayor estabilidad de la enzima al fenómeno proteolítico. De igual manera se puede concluir que la degradación proteolítica de la DsrS nativa se incrementa con el tiempo de almacenamiento dando como resultado la pérdida de actividad y cambios en la especificidad enzimática.

Al almacenar la enzima a 4°C y pH 5.2, en presencia y/o ausencia de inhibidores de proteasas se identificaron mediante los análisis de Western Blot proteínas de alto peso molecular (entre 170 y 150 kDa), las cuales, equivalen a las formas derivadas del procesamiento proteolítico de la DsrS reportadas por Sánchez y col. (1999). Aunado a esto se logró identificar además otras formas de peso molecular menor a 150 kDa derivadas de la proteólisis de esta enzima.

Con lo anterior se concluye que: 1) las tres formas proteolizadas de la enzima observadas por Sánchez y col. (1999) mediante zimogramas, no son las únicas formas producto de la proteólisis de la DsrS; 2) el pH, la temperatura y el tiempo de almacenamiento afectan de manera drástica el procesamiento proteolítico; y 3) los inhibidores de proteasas le confieren a la dextransacarasa cierta estabilidad frente al fenómeno proteolítico, particularmente a pH 5.2 y temperatura de almacenamiento a 4°C.

V. 2. Estudio del procesamiento proteolítico en la dextransacarasa (DsrS) recombinante

V. 2. 1 Caracterización del fenómeno proteolítico de la DsrS recombinante

Para lograr una caracterización detallada el fenómeno proteolítico de la dextransacarasa (DsrS) recombinante expresada en *E. coli* DH5 α (estrategia experimental IV.3), se decidió utilizar una enzima que tuviera fusionada en su extremo N-terminal, la proteína tioredoxina y en su extremo C-terminal una etiqueta de histidinas, denominada Trx-DsrS-His (Figura 29), la cual nos ayudaría mediante inmunoensayos a identificar la ubicación de los cortes proteolíticos.



Figura 29. DsrS recombinante fusionada al N-terminal a la tioredoxina y al C-terminal a una etiqueta de histidinas.

La proteólisis de Trx-DsrS-His durante la extracción se analizó mediante: geles de SDS-PAGE teñidos por Coomassie, zimograma y Western blot con anticuerpos Anti-Histidinas (Anti-His), Anti-Tiorredoxina (Anti-Trx) y Anti-dextransacarasa (Anti-DsrS).

Como podemos observar en los zimogramas y en los geles de SDS-PAGE teñidos por coomassie de la Trx-DsrS-His recién extraída (Figura 30). El procesamiento proteolítico de la enzima se presenta en ambas regiones (C y N-terminal), las bandas producto de la degradación proteolítica son similares a las identificadas para la enzima nativa.

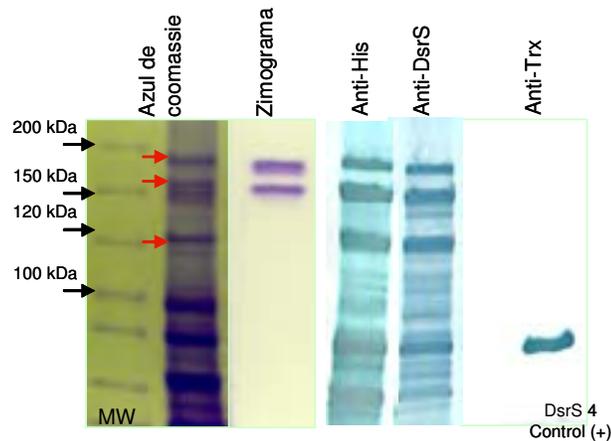


Figura 30. Análisis del fenómeno proteolítico de la DsrS recombinante al momento de la extracción de la enzima.

Por otro lado, en el análisis de Western Blot, los anticuerpos Anti-Trx, no reaccionaron con ninguna de las bandas (incluyendo la forma precursora de 200 kDa), lo que sugiere que las formas derivadas del procesamiento proteolítico de la Trx-DsrS-His carecen de la región N-terminal. Por otro lado, los anticuerpos Anti-His y Anti-DsrS reaccionaron con la forma precursora de 200 kDa y con múltiples formas derivadas del procesamiento proteolítico de la DsrS recombinante, confirmando que la mayoría de las formas proteolizadas son producto de cortes en el N-terminal.

Sin embargo, ligeras diferencias entre las bandas observadas en los análisis con Anti-His y Anti DsrS indican que también existen cortes por el extremo C-terminal. Estos resultados no concuerdan con lo reportado por Argüello y Col (2005) para la enzima nativa, quienes proponen que el primer corte proteolítico se realiza en la región N-terminal y las siguientes formas activas derivadas de este fenómeno son resultado de procesamiento proteolítico en la región C-terminal.

Moulis y col (2006a), recientemente reportan la presencia de sólo 3 formas derivadas del procesamiento proteolítico de la Trx-DsrS-His detectadas mediante Western blot Anti-His (Figura 15), sin embargo, en nuestros análisis de Western Blot con el mismo anticuerpo Anti-His podemos observar un mayor número de formas (bandas) derivadas del fenómeno proteolítico en Trx-DsrS-His recién extraída (Figura 30). Con base en lo anterior se concluye que en la DsrS recombinante el procesamiento proteolítico se presenta en ambas regiones de la proteínas (N y C-terminal), a diferencia de lo reportado para la DsrS enzima nativa en donde los cortes proteolíticos se dan en la región C-terminal, de acuerdo a lo reportado por Argüello y col. (2005).

V. 2. 2 Efecto de los inhibidores de proteasas en el proceso de producción y extracción de la enzima recombinante

Una vez caracterizado el fenómeno proteolítico en la Trx-DsrS-His, así como, la orientación de los cortes proteolíticos en la enzima recombinante durante la extracción, se propuso determinar si era posible, mediante la utilización de inhibidores de proteasas evitar, la proteólisis de la enzima (estrategia experimental IV. 4A). Para tal efecto, se agregaron los inhibidores de proteasas Complete (cóctel de inhibidores de metalo, serino y cistein proteasas) y Pepstatina (inhibidor de aspártico proteasas) durante la fermentación y durante la extracción de la enzima recombinante de acuerdo con lo descrito a la Tabla 7.

Al analizar los resultados mediante zimograma no se observó diferencia alguna en el número de formas activas derivadas de la proteólisis de la DsrS recombinante (Figura 31) en presencia o ausencia de inhibidores de proteasas durante los pasos de fermentación y extracción de la enzima.

Tabla 7. Inhibidores de proteasas empleados en el proceso de fermentación y extracción de la DsrS recombinante: Complete y Pepstatina.

Muestra	Plásmido/Proteína	Fermentación	Extracción
1	pBAD		
2	pDXCP/DsrS (Control)		
3	pDXCP/DsrS	Complete	
4	pDXCP/DsrS	Complete	Complete
5	pDXCP/DsrS		Pepstatina
6	pDXCP/DsrS		Complete
7	pDXCP/DsrS		Complete y Pepstatina
8	pDXCP/DsrS	Pepstatina	
9	pDXCP/DsrS	Pepstatina	Pepstatina

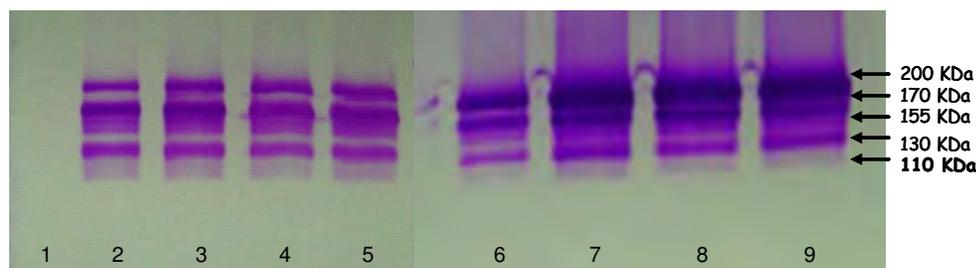


Figura 31. Zimograma que muestra el efecto de los inhibidores de proteasas en la proteólisis de la DsrS recombinante expresada en *E. coli* DH5 α , durante el proceso de producción y extracción de la enzima. La numeración corresponde a los ensayos realizados de acuerdo a la tabla 7.

Como se puede observar no existe diferencia alguna entre la proteína control (2) la cual no estuvo en presencia de inhibidores de proteasas y el empleo de los inhibidores de proteasas. Los zimogramas se realizaron inmediatamente después de extraer la proteína.

A partir de estos resultados podemos concluir que la utilización de inhibidores de proteasas Complete y Pepstatina no detienen el proceso proteolítico que sufre de la dextranasa DsrS recombinante, a pesar de ser agregados desde el inicio del proceso de síntesis de la enzima y nuevamente antes de la extracción.

El pH es un factor importante en la actividad de ciertos inhibidores de proteasas. Con la finalidad de determinar si este factor influye en la actividad inhibitoria de estos compuestos sobre el fenómeno proteolítico de la DsrS recombinante, se realizaron ensayos de extracción de la enzima utilizando amortiguadores a diferente pH (4.8, 5.2 y 6.8) en presencia y ausencia de inhibidores de proteasas (estrategia experimental IV. 4B). Al analizar los zimogramas (Figura 32) tampoco se observó diferencia en el patrón proteolítico de las muestras. Por tanto, el pH del buffer de extracción no influye en la actividad de los inhibidores de proteasas sobre la proteólisis de la enzima.

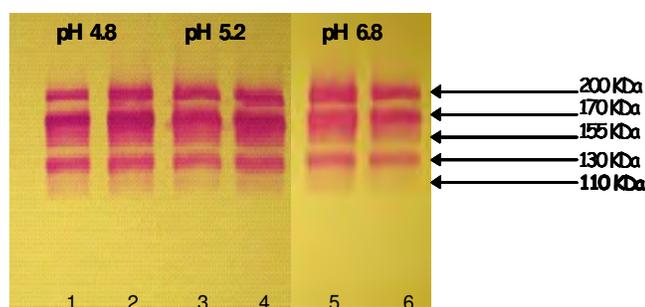


Figura 32. Efecto del pH en la actividad de los inhibidores de proteasas sobre la proteólisis de la DsrS recombinante. Los zimogramas se realizaron inmediatamente después de la extracción de la enzima. 1, 3 y 5) DsrS sin inhibidores de proteasas. 2, 4 y 6) DsrS con inhibidores de proteasas.

V. 2. 3 Efecto de los inhibidores de proteasas, pH, temperatura y tiempo de almacenamiento en el procesamiento proteolítico de la dextranasa (DsrS) recombinante.

Con el fin de determinar si las condiciones de almacenamiento afectan la proteólisis de la dextranasa recombinante, se decidió estudiar este fenómeno proteolítico bajo diferentes condiciones de almacenamiento de la enzima recombinante (Trx-DsrS-His). Para lo anterior, al igual que la DsrS nativa, almacenamos la Trx-DsrS-His a dos temperaturas: 4°C y temperatura

ambiente; a pH: 5.2 y 8.0; y en presencia y ausencia de inhibidores de proteasas (estrategia experimental III. 5). El monitoreo de la proteólisis de las dextranasa, almacenada a 4°C se realizó durante 150 días de incubación. La evaluación de procesamiento proteolítico de las muestras se realizó mediante análisis de SDS-PAGE, zimogramas, Western Blot (Anti-DsrS) y actividad enzimática.

En el análisis mediante Western Blot con los anticuerpos Anti-His de DsrS recombinante almacenada a 4°C en ambos pH, podemos observar que a 120 días prácticamente todas las formas derivadas del procesamiento proteolítico ha perdido la región C-terminal en ausencia de inhibidores de proteasas, mientras que en las muestras almacenadas con inhibidores de proteasas la eliminación de la región C-terminal aunque severa, no es total (Figura 33A). Estos resultados indican que, al igual que en la DsrS nativa, los inhibidores de proteasas retrasan la proteólisis de la DsrS recombinante. Dado lo anterior, suponemos la presencia tanto de proteasas susceptibles a dichos inhibidores, como de proteasas no susceptibles, ya que estos inhibidores no son universales.

Por otro lado, los análisis de Western Blot utilizando anticuerpos Anti-DsrS muestran (Figura 33B) que la Trx-DsrS-His almacenada a 4°C tanto a pH 5.2 y pH 8.0 sigue sufriendo procesamiento proteolítico. Sin embargo, los resultados con la enzima incubada a pH 8.0 durante 120 días muestran un mayor número de formas proteolizadas, que la almacenada a pH 5.2. En la muestra almacenada durante 150 días sin inhibidores de proteasas a pH 5.2 se observó un mayor procesamiento proteolítico comparada con la muestra almacenada bajo las mismas condiciones en presencia de inhibidores de proteasas. La enzima almacenada a pH 8.0 sin inhibidores de proteasas no muestran señal con los anticuerpos utilizados (Anti-DsrS), debido probablemente a que esta enzima está completamente proteolizada, demostrando que al igual que en la enzima nativa, el almacenamiento de ésta a pH 8.0 favorece y acelera el procesamiento proteolítico.

Un detalle interesante es que a los 120 días de incubación prácticamente ninguna proteína de alto peso molecular se detecta con los anticuerpos anti-His en ausencia de inhibidores de proteasas, mientras que con los anticuerpos anti-DsrS aun podemos ver bandas de alto peso molecular. Estos resultados sugieren que a este tiempo de almacenamiento la etiqueta de histidinas de la enzima recombinante se eliminó completamente.

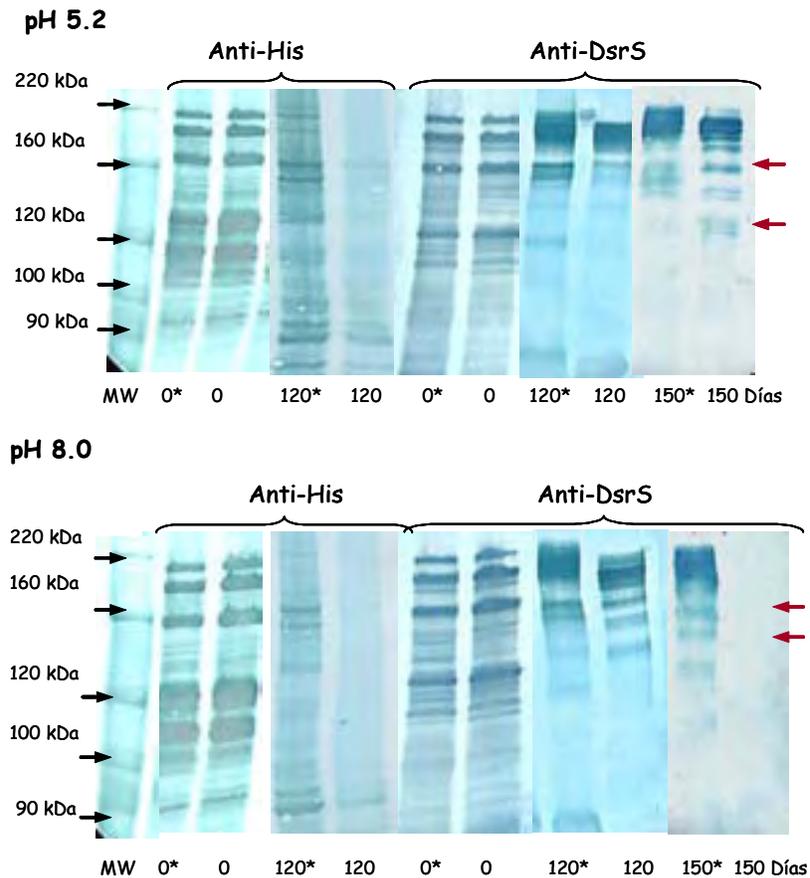


Figura 33. Efecto del pH, uso de inhibidores de proteasas y tiempo de almacenamiento a 4°C, en el procesamiento proteolítico de la DsrS recombinante, mediante análisis de Western Blot utilizando anticuerpos Anti-His (A) y anticuerpos Anti-DsrS (B). (*) Muestra almacenada en presencia de los inhibidores de proteasas Complete y Pepstatina.

En los ensayos de actividad de la enzima almacenada a 4°C, correspondiente a las muestras analizadas en la Figura 33, se observa una pérdida del 50% de actividad en los extractos almacenados a pH 5.2 durante los primeros 5 días, luego la actividad se mantiene estable durante los restantes 120 días (Figura 34). En contraste, las muestras almacenadas a pH 8.0 se observa una disminución gradual de actividad hasta perder un total del 80% de la actividad a los 120 días. A pesar de observar en ambas muestras una caída de actividad a los 5 días de almacenamiento, las determinaciones de la relación hidrólisis/transferencia demuestran que esta disminución de la actividad no corresponde a un cambio en la especificidad de la enzima, como el ocurrido en la enzima nativa (Datos no mostrados).

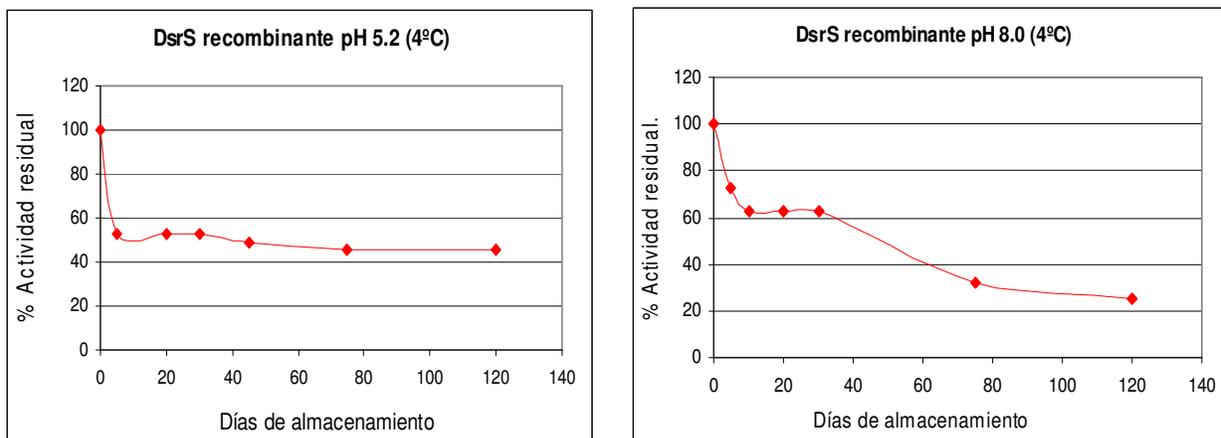


Figura 34. Efecto de las condiciones de almacenamiento en la actividad de la DsrS recombinante, almacenada sin inhibidores de proteasas a diferentes valores de pH. La determinación de la actividad enzimática se realizó a pH 5.2.

Al almacenar los extractos enzimáticos a temperatura ambiente y analizarlos con los dos anticuerpos (Anti-His y Anti-DsrS) se observó una mayor velocidad del procesamiento proteolítico (Figura 35), lo que concuerda con los resultados obtenidos con la enzima nativa.

La proteína almacenada durante 30 días mostró que a pH 8.0 el procesamiento proteolítico es altamente favorecido llegando a la pérdida casi total de las formas proteolizadas detectadas por los anticuerpos. No obstante lo anterior, a pH 5.2 durante este tiempo de almacenamiento aún pueden ser identificadas algunas de estas formas proteolizadas utilizando anticuerpos Anti-His. Bajo estas condiciones, los inhibidores de proteasas no mostraron la capacidad de retardar el procesamiento proteolítico observado, particularmente a pH 8.0, si bien a pH 5.2 sí se pudo observar esta capacidad.

Observamos una pérdida de la actividad enzimática acelerada en los extractos almacenados a temperatura ambiente (Figura 36). De la misma forma, observamos una pérdida total de la actividad transferasa (incrementándose la actividad hidrolasa) después de un día de almacenamiento a temperatura ambiente, independientemente del pH de almacenamiento (datos no mostrados).

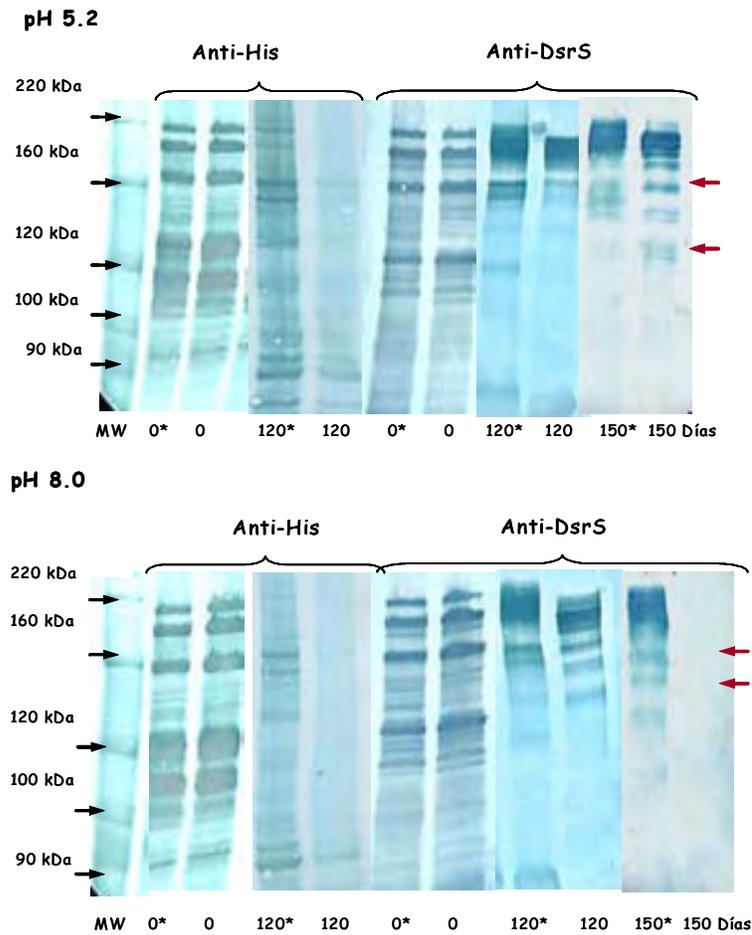


Figura 35. Efecto del pH, uso de inhibidores de proteasas y tiempo de almacenamiento a temperatura ambiente, en el procesamiento proteolítico de la DsrS recombinante, mediante análisis de Western Blot utilizando anticuerpos Anti-His y Anti-DsrS. (*) Muestra almacenada en presencia de los inhibidores de proteasas Complete y Pepstatina.

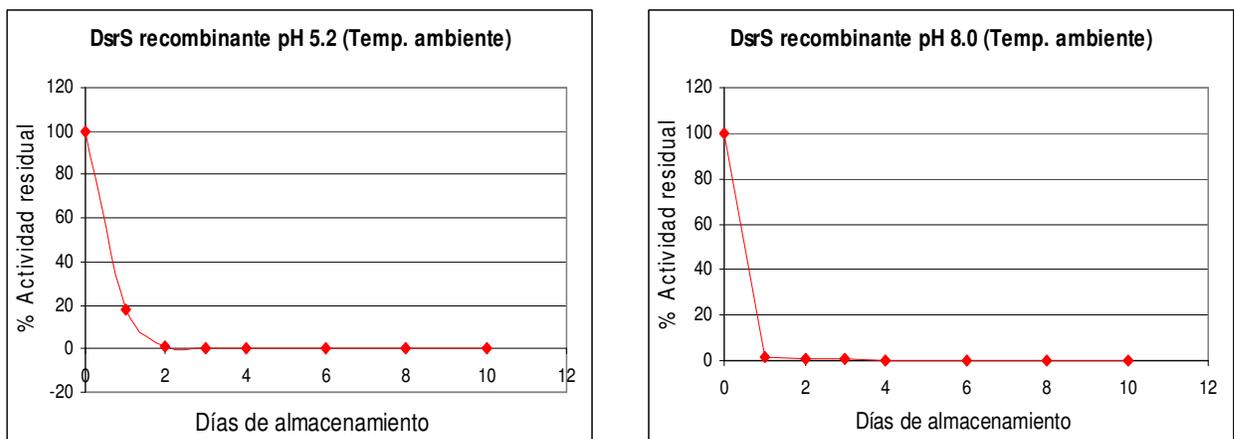


Figura 36. Efecto de las condiciones de almacenamiento en la actividad de la DsrS recombinante almacenada sin inhibidores de proteasas a diferentes valores de pH. La determinación de la actividad enzimática se realizó a pH 5.2.

Podemos concluir que la dextransacarasa recombinante sufre un procesamiento proteolítico más severo que la enzima nativa bajo las mismas condiciones y a tiempos largos de almacenamiento, como podemos observar en la Figura 37. Estas diferencias en el procesamiento proteolítico de DsrS pueden deberse a diferencias en el sistema proteolítico del hospedero heterólogo *E. coli* (Gottesman, 1996) y el sistema proteolítico de las bacterias ácido-lácticas (Sánchez-González y cols., 1999; Savijoki y cols., 2006), específicamente en el número de proteasas y la actividad proteolítica que presentan ambos microorganismos.

En general podemos concluir que no existen condiciones de almacenamiento que eviten el proceso proteolítico que sufre la DsrS; que éste es más severo en la enzima recombinante, y que, de las condiciones ensayadas, 3 días son suficientes para proteolizar el dominio catalítico a temperatura ambiente tanto a pH 5.2 como a pH 8.0.

Sin embargo, aunque muy escasas, algunas bandas permiten concluir que el uso de inhibidores de proteasas retrasa la proteólisis. Cuando el almacenamiento se lleva a cabo a 4°C el proceso global se retrasa. Para que la proteólisis alcance el dominio catalítico se requirieren 120 días, aunque nuevamente, la presencia de inhibidores de proteasas también retrasa el proceso proteolítico.

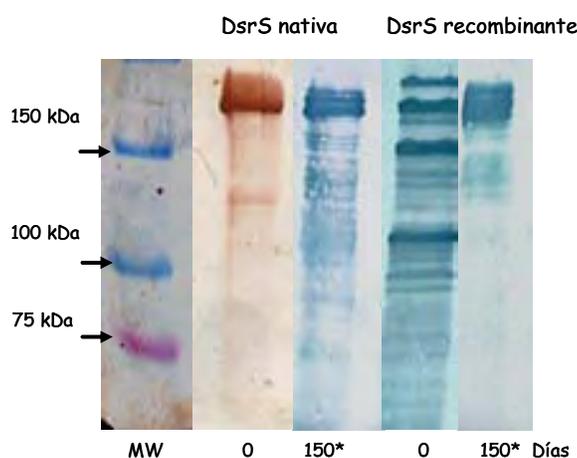


Figura 37. Comparación del fenómeno proteolítico de la DsrS nativa y recombinante, almacenadas 150 días pH 5.2 a 4°C. Mediante Western blot utilizando anticuerpos Anti-DsrS

El uso de anticuerpos permite concluir que la secuencia de la degradación proteolítica inicia claramente en el amino terminal, actuando desde el proceso de producción, siendo por lo mismo el sitio más susceptible a la proteólisis. El hecho de seguir detectando formas activas con el anticuerpo Anti-His, es evidencia de que existen cortes adicionales por el amino terminal, pero que no alcanzan el dominio catalítico.

Finalmente, formas activas que reconocen el anticuerpos Anti-DsrS, pero ya no el Anti-His (Figura 33) demuestran que el dominio catalítico es el más resistente a la proteólisis.

V. 3 Naturaleza del fenómeno proteolítico de la dextranasa (DsrS)

V. 3. 1. Caracterización proteolítica de la enzima recombinante libre de proteasas

Se han propuesto dos mecanismos como responsables de la degradación proteolítica de la DsrS nativa y de la recombinante: el primero es que el procesamiento lo lleva a cabo el sistema proteolítico del microorganismo productor y el segundo, que puede tratarse de un mecanismo autoproteolítico. Una tercera posibilidad es que ambos mecanismos estén involucrados en la degradación de esta enzima.

La primera hipótesis, el efecto de las proteasas del hospedero heterólogo, se fundamenta en el trabajo de Sánchez-González y col. (1999) en el que se reporta la presencia de actividad proteolítica en la misma fracción donde se localiza la enzima. La segunda hipótesis, autoproteólisis, se apoya en el hecho de que este fenómeno proteolítico es independiente del fondo genético y que la presencia o uso de inhibidores de proteasas no inhibe totalmente este procesamiento. Por lo tanto, se decidió determinar si el fenómeno proteolítico continúa o se detiene cuando la dextranasa está pura, o bien, libre de proteasas.

Para obtener la enzima recombinante libre de proteasas, se purificó mediante cromatografía de afinidad a níquel (Figura 38) y se analizó mediante geles SDS-PAGE teñidos con azul de coomassie, identificándose las 3 formas predominantes ya reportadas, así como otras formas de menor peso molecular, en menor proporción, ya que aún contienen la etiqueta de histidinas.

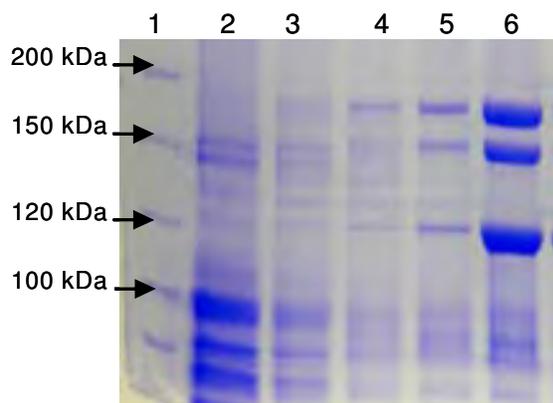


Figura 38. Purificación de la DsrS recombinante por cromatografía de afinidad a níquel. Proteínas teñidas con azul de Coomassie.

- 1) Marcador peso molecular.
- 2) DsrS previa a la purificación
- 3) Recirculado.
- 4-5) Lavados de la resina.
- 6) Elusión de la proteína.

Con la finalidad de tener un mejor panorama de este fenómeno proteolítico en la DsrS purificada, la enzima se almacenó a temperatura ambiente, a pH 5.2 y pH 8.0, y en presencia y ausencia de inhibidores de proteasas complete y pepstatina (estrategia experimental IV. 6), el monitoreo se llevó a cabo durante 4 días. (Figura 39).

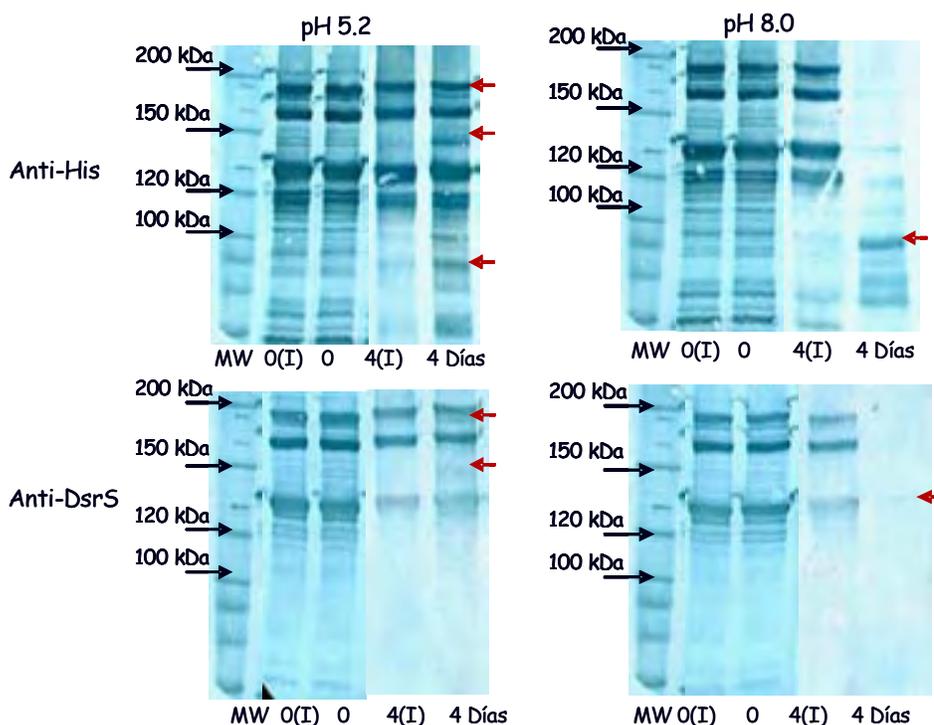


Figura 39. Monitoreo del fenómeno proteolítico de la DsrS recombinante, semipurificada y almacenada a temperatura ambiente, mediante análisis de Western Blot utilizando anticuerpos Anti-His y Anti-DsrS. De manera simultánea se muestra un comparativo entre las proteínas almacenadas a pH 5.2 y pH 8.0. (I) En presencia de inhibidores de proteasas

En la enzima almacenada a pH 8.0 observamos, como resultado del procesamiento proteolítico, una pérdida total de las proteínas de alto peso molecular, así como un enriquecimiento de las formas proteolizadas de bajo peso molecular (Figura 39). Cabe señalar que en esta muestra se da una pérdida total de la actividad dextransacarasa, debida seguramente a la rápida proteólisis de la enzima (datos no mostrados). En la muestra almacenada a pH 5.2 el procesamiento proteolítico a los cuatro días es apenas perceptible en ausencia de inhibidores de proteasa (Figura 39), sin embargo a un mayor tiempo de almacenamiento el procesamiento proteolítico continúa hasta la pérdida de la definición de las formas proteolizadas (datos no mostrados). En ambas muestras se observa que el uso de inhibidores de proteasas confiere mayor estabilidad frente al procesamiento proteolítico.

Con base en los resultados preliminares obtenidos de la DsrS semipurificada y almacenada a temperatura ambiente, se puede concluir que la purificación parcial de la enzima incrementa sensiblemente su estabilidad a la proteólisis por lo que decidimos analizar el comportamiento de la enzima semipurificada bajo las condiciones óptimas de almacenamiento, esto es, las condiciones en las cuales se encontró que tanto los extractos de la enzima nativa como los

extractos de la enzima recombinante mostraron una mayor estabilidad frente al procesamiento proteolítico (4°C y pH 5.2; en presencia y ausencia de inhibidores de proteasas). El monitoreo de la enzima se realizó durante 75 días. Estos resultados se muestran en la Figura 40, en la que se puede observar que no hay una diferencia marcada en la muestra fresca después de 75 días de almacenamiento, aunque si una ligera disminución en la intensidad de la banda de 220 kDa y un ligero incremento en la intensidad de las formas proteolizadas de bajo peso molecular de la DsrS.

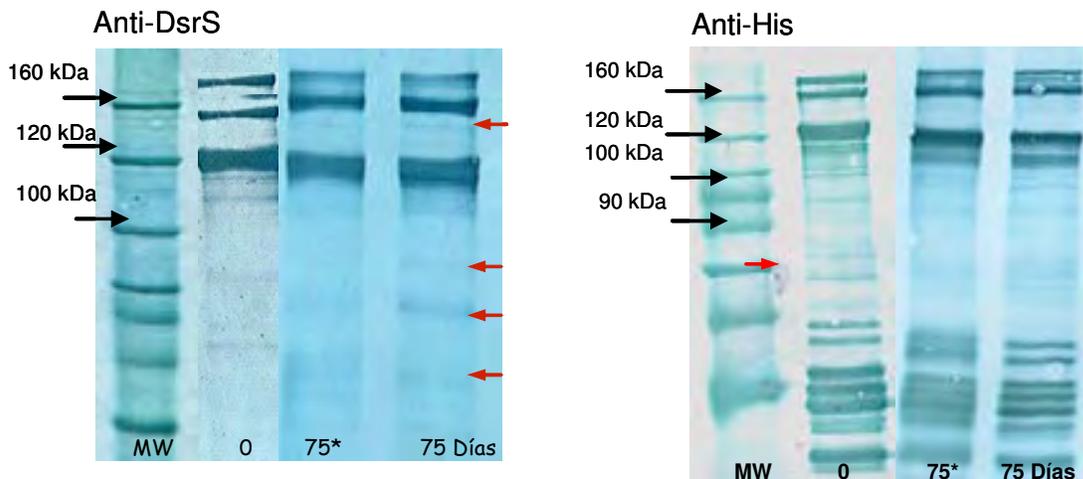


Figura 40. Monitoreo del fenómeno proteolítico de la DsrS recombinante semipurificada y almacenada a 4°C durante 75, mediante análisis de Western Blot utilizando anticuerpos Anti-DsrS y Anti-His. (I) Almacenada en presencia de inhibidores de proteasas.

Es entonces posible concluir que a pesar de haber disminuido radicalmente el fenómeno de proteólisis, el fenómeno proteolítico se sigue presentando, aunque a una velocidad menor de procesamiento. Dado lo anterior podemos definir que las condiciones de almacenamiento más adecuadas para retrasar este fenómeno en la DsrS son: Temperatura 4°C pH 5.2 y en presencia de inhibidores de proteasas, siempre y cuando se purifique la enzima.

Sin embargo, el hecho de que se observe proteólisis sugiere que la enzima no está totalmente pura o que este procesamiento es llevado a cabo por un mecanismo autocatalítico.

V. 3. 2 Análisis de electroforesis de proteínas de doble dimensión (SDS-PAGE 2D)

Con el fin de observar el comportamiento a la proteólisis de una forma pura de la dextransacarasa se decidió purificar la enzima mediante cromatografía de afinidad a níquel seguida por electroelución a partir de geles de SDS-PAGE (estrategia experimental IV. 7). Debido a la gran cantidad de bandas obtenidas como producto de la proteólisis que muestra la DsrS, sólo fueron electroeluidas las formas de mayor peso molecular: 170 y 155 kDa (fracción

TDH1) y la forma de 120 kDa (Fracción TDH2). Se analizaron muestras de las fracciones electroeluidas tanto al inicio como al final del almacenamiento mediante geles de SDS-PAGE teñidos con azul de coomasie, zimograma y Western Blot (Anti-DsrS).

Las fracciones TDH1 y TDH2 después de la electroelusión contienen únicamente las proteínas de 170 y 155 kDa en la fracción TDH1 y la forma de 120 kDa la fracción TDH2, según se observa en geles de SDS-PAGE teñidos por coomasie. Sin embargo en los ensayos de western con anticuerpos Anti-DsrS, además de las formas antes mencionadas, observamos bandas de peso molecular ligeramente menor, de este modo demostramos productos de la proteólisis presentes en estas fracciones (Figura 41). En los zimogramas únicamente se detectaron las proteínas de la fracción TDH1, lo que demuestra que estas enzimas aún mantienen actividad pese a la electroelusión, mientras que la fracción TDH2 no presenta actividad polimerasa, concordando con lo reportado por Moulis y col. (2006), quien reporta que las formas de 170 y 150 kDa son las únicas que presentan actividad glucosiltransferasa.

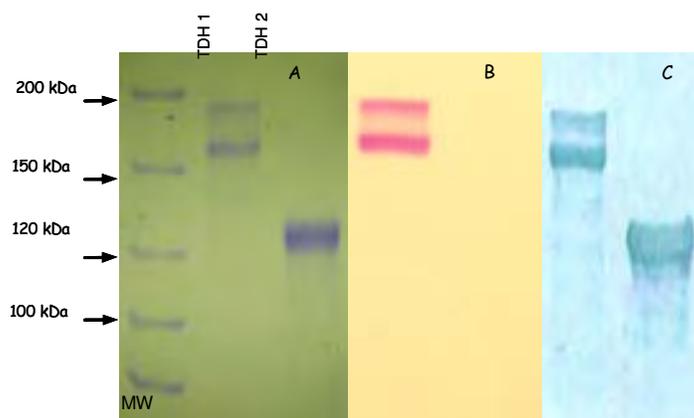


Figura 41. Análisis de las fracciones TDH1 y TDH2 purificadas por electroelusión mediante: A) SDS-PAGE teñido con azul de coomasie. B) Zimograma y C) Western Blot utilizando anticuerpos Anti-DsrS.

Las fracciones TDH1 y TDH2, tras la electroelusión, se almacenaron bajo las siguientes condiciones: buffer de acetatos 20mM pH 5.2 a 4°C, sin inhibidores de proteasas, por un período de 20 días. Al analizar los muestras mediante Western Blot utilizando anticuerpos Anti-DsrS se observó la aparición de formas derivadas de la proteólisis en ambas fracciones. Estos resultados sugieren que el fenómeno proteolítico que experimenta la dextransacarasa DsrS es un procesamiento autocatalítico (Figura 42).

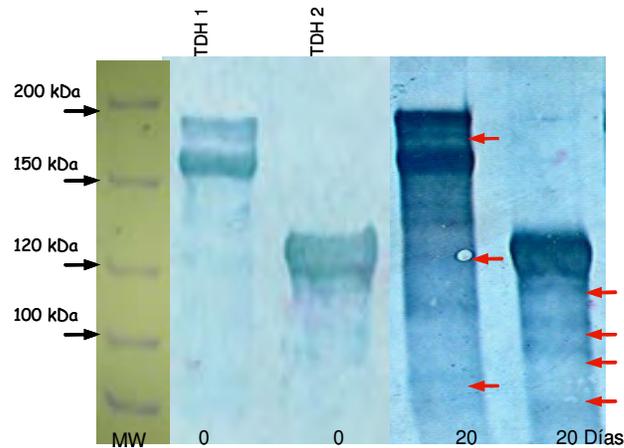


Figura 42. Western Blot utilizando anticuerpos Anti-DsrS, de las fracciones TDH1 Y TDH2 purificadas por electroelución, almacenadas a 4°C sin inhibidores de proteasas, por un período de 20 días.

Debido a las evidencias encontradas que sugieren que el fenómeno que sufre la dextransacarasa (DsrS) es en parte debido a una autoproteólisis, surge la necesidad de obtener mayor información que apoye esta aseveración, para lo cual, nos dimos a la tarea de realizar análisis de electroforesis de doble dimensión con la fracción TDH1. Se utilizó la fracción TDH1 (170 kDa y 155 kDa) debido a que esta contiene una mayor concentración de proteína y es a partir de estas formas que se derivan las formas proteolizadas de menor peso molecular. Una vez electroeluida la fracción TDH1, se sometió a SDS-PAGE 2D. El análisis de los resultados se hizo mediante ensayos de Western Blot y anticuerpos Anti-DsrS. A pesar de haber tenido problemas con el enfoque isoelectrico (pI) de la DsrS, se observa en los geles de doble dimensión, un fenómeno de alargado a nivel horizontal en ambos sentidos del punto isoelectrico de la enzima (DsrS pI:4.11) el cual probablemente se debe a la pérdida de pequeños péptidos (o fragmentos) que dan lugar a cambios en el punto isoelectrico de la enzima sin modificar su peso molecular aparente. En el tiempo cero, la forma de 170 kDa (forma precursora) se encuentra en una menor proporción respecto a la forma de 155 kDa (Figura 43).

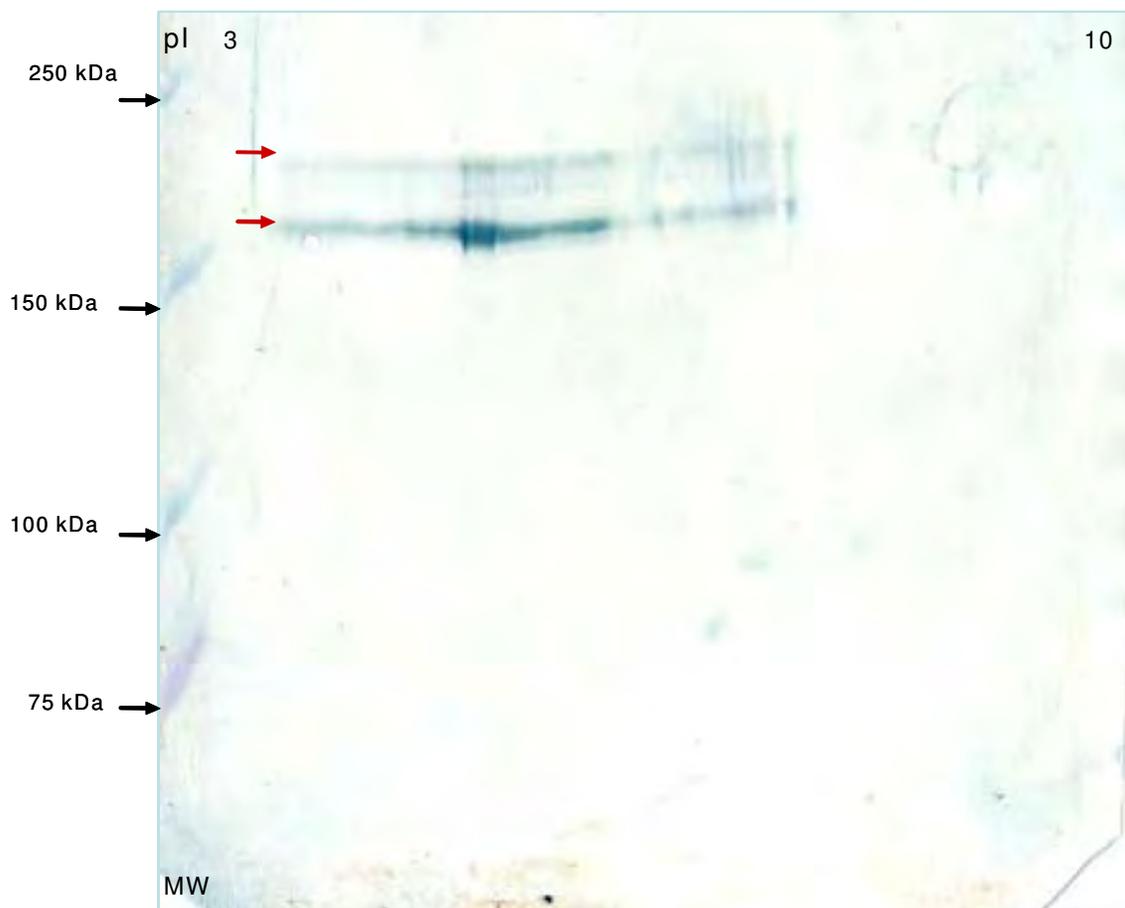


Figura 43. SDS-PAGE 2D de la fracción TDH 1 (Formas de 170 y 150 kDa). Analizada al momento de la electroelución mediante Western Blot utilizando anticuerpos Anti-DsrS.

En la fracción TDH1 almacenada 5 días a temperatura ambiente a pH 5.2 (Figura 44) se observó la aparición de nuevas formas proteolizadas de bajo peso molecular, similares a las identificadas en los ensayos anteriores. Estos resultados apoyan la hipótesis propuesta acerca de la naturaleza autocatalítica de este procesamiento proteolítico.

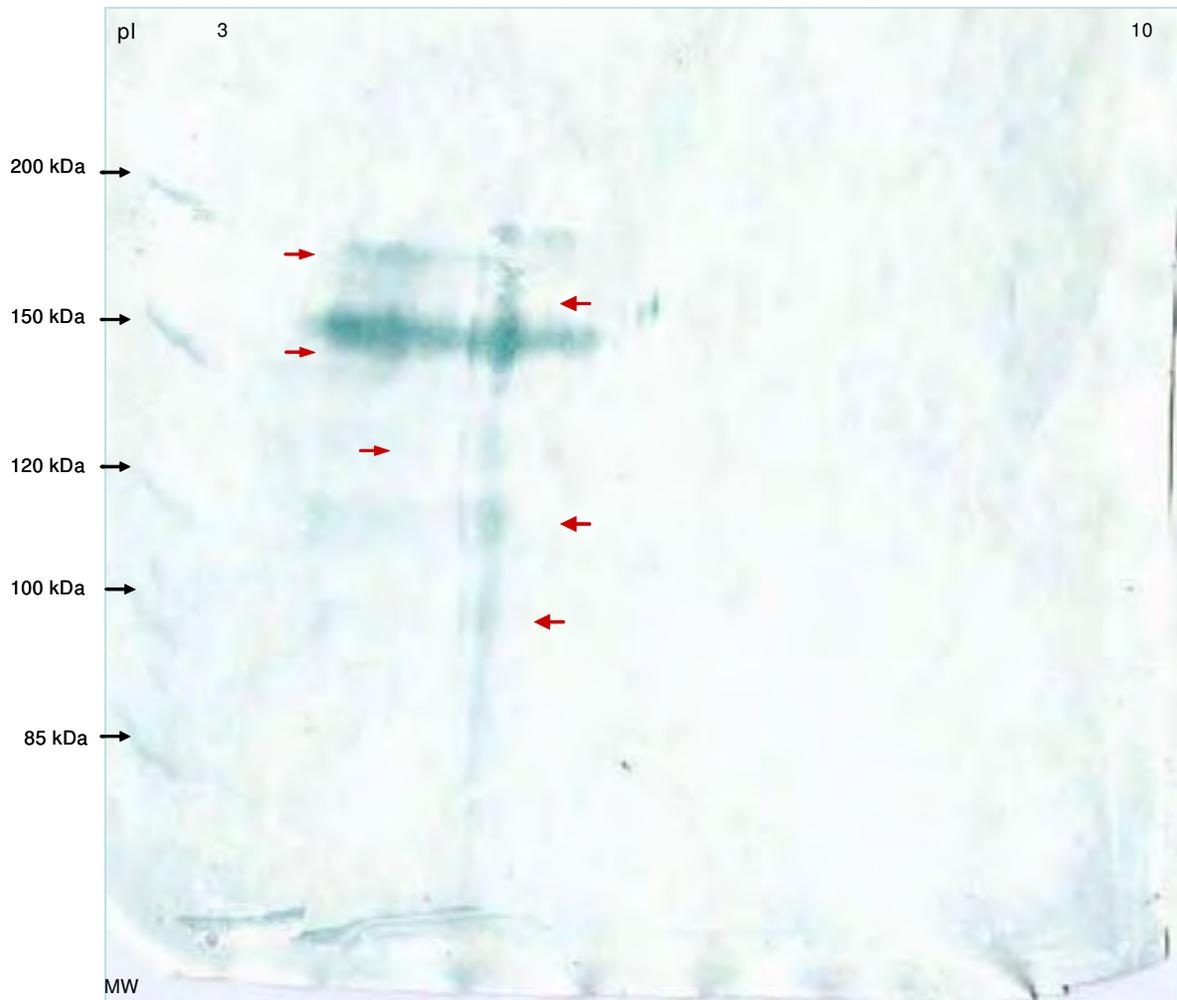


Figura 44. SDS-PAGE 2D de la fracción TDH 1 (Formas de 170 y 150 kDa) a 5 días de almacenamiento a temperatura ambiente y pH 5.2 mediante Western Blot utilizando anticuerpos Anti-DsrS.

Por otro lado se analizó una muestra de la fracción TDH1, almacenada 10 días a 4°C, y se observó (Figura 45) que el procesamiento autoproteolítico que experimenta esta enzima bajo estas condiciones, se lleva a cabo de manera similar al observado en la muestra almacenada a temperatura ambiente.

Estos resultados concuerdan con los ensayos sobre la proteólisis de una versión truncada de la inulosacarasa de *Leuconostoc citreum* EIS3 donde se observó mediante zimogramas de doble dimensión (Figura 46) varias formas activas de diferente punto isoeléctrico con el mismo peso molecular, además las formas con diferente peso molecular ya observadas (Ortiz-Soto y Rodríguez-Alegría.).

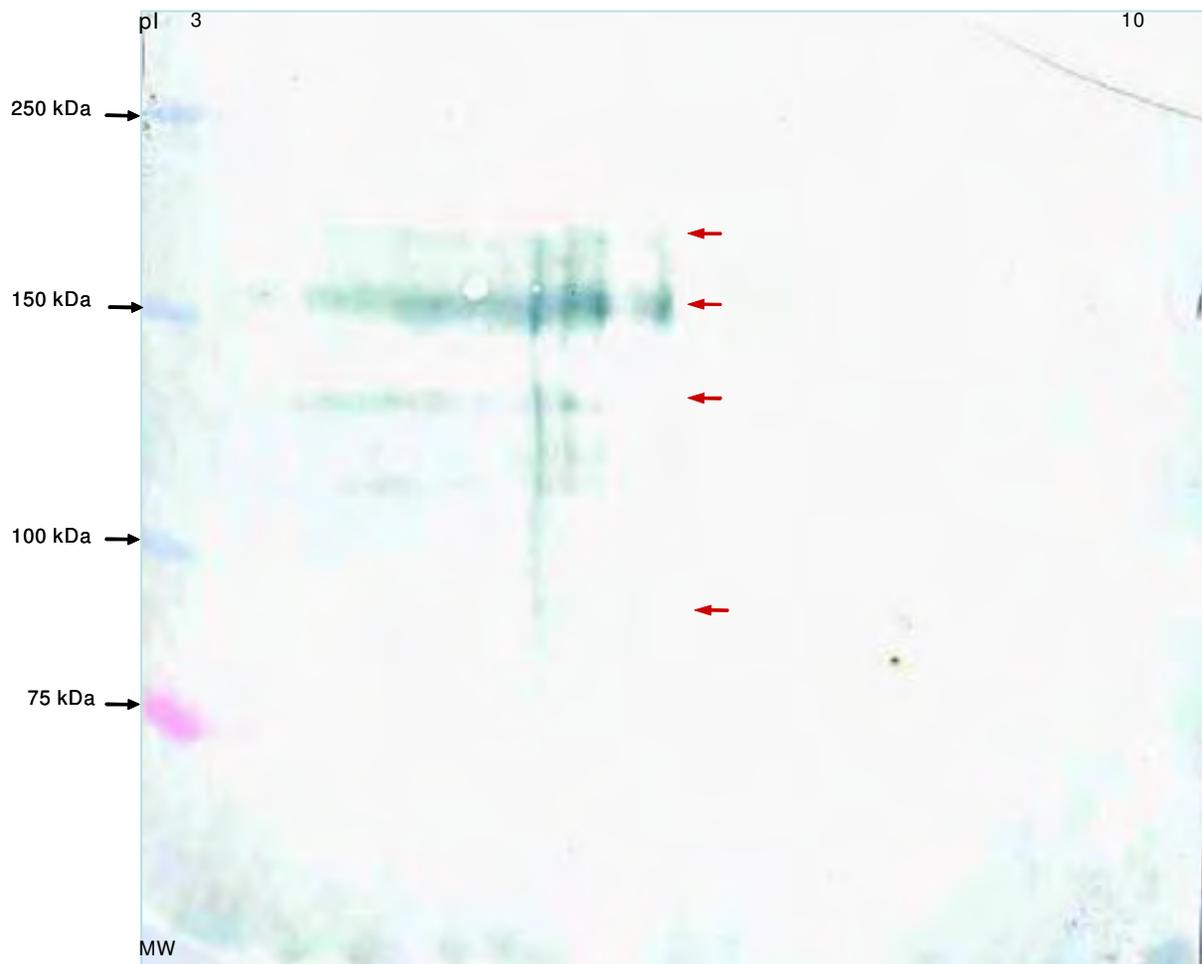


Figura 45. SDS-PAGE 2D de la fracción TDH 1 (Formas de 170 y 150 kDa) a 10 días de almacenamiento a 4°C y pH 5.2 mediante Western Blot utilizando anticuerpos Anti-DsrS.

Los resultados obtenidos con la fracción TDH1 tanto en electroforesis de una como de doble dimensión, sustentan la hipótesis de un procesamiento autocatalítico como el origen de la variabilidad de formas proteolizadas encontradas en las preparaciones de la dextransacarasa.

Este autoprocesamiento no sería específico, sino que, se trata de un procesamiento procesivo donde pocos aminoácidos se eliminan de manera secuencial en ambos extremos de la proteína, lo que resulta en cambios de peso molecular y punto isoeléctrico de la proteína. Sin embargo, ensayos que demuestren de manera contundente la naturaleza autoproteolítica de este fenómeno son aún necesarios.

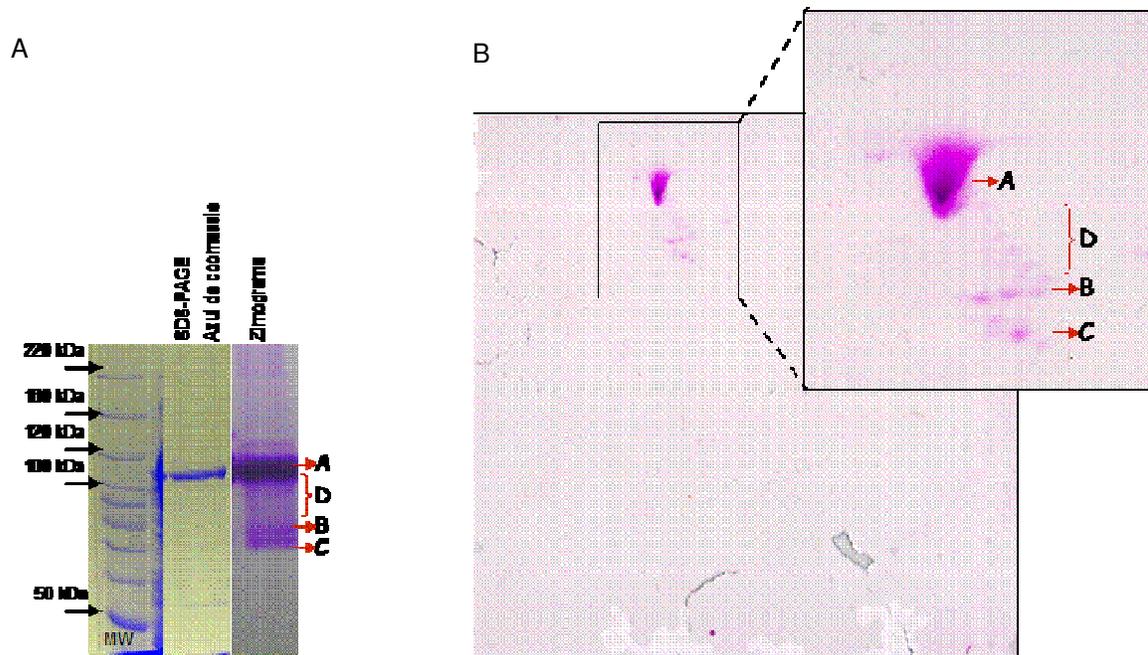


Figura 46. Ensayos sobre la proteólisis de la EIS3 realizados por Ortiz-Soto y Rodríguez A. A) Caracterización del fenómeno proteolítico mediante SDS-PAGE y zimograma. B) Zimograma de doble dimensión de la EIS3.

En resumen, podemos sugerir que la dextransacarasa es proteolizada por un fenómeno autocalítico, el cual se favorece por la presencia de las proteasas del hospedero heterólogo, que conlleva la pérdida de enzimas de alto peso molecular y en el enriquecimiento de proteínas de menor peso molecular. Este procesamiento autoproteolítico deriva en formas activas e inactivas como resultado del procesamiento de la enzima en ambos extremos de la proteína (N y C-terminal).

V. 4 Papel de los dominios N-terminal y C-terminal en el fenómeno autoproteolítico de la dextranasa (DsrS)

Dado que este fenómeno proteolítico se presenta en otras glucosil y fructosiltransferasas de *Leuconostoc*, enzimas que presentan regiones N-terminal y C-terminal flanqueando el dominio catalítico, surgió la hipótesis de que estas regiones podrían ser las responsables de este autoprocesamiento. Se decidió entonces analizar el fenómeno proteolítico exclusivamente en el dominio catalítico (Barril TIM) de la DsrS libre de regiones N y C-terminal. Se realizó la construcción pThioBarrilHis, la cual contiene el fragmento de DNA que codifica para el dominio catalítico de la dextranasa (DsrS). A este dominio catalítico (DC) se le fue fusiono en el N-terminal a la tiorredoxina y a una etiqueta de histidinas en el C-terminal (Figura 47).



Figura 47. Construcción pThioBarrilHis, que expresa el dominio catalítico de la DsrS fusionada en el N-terminal a tiorredoxina y en el C-terminal a una etiqueta de histidinas.

Esta proteína de 100 kDa, se expresó en *E. coli* y se llevó a cabo un análisis para determinar la localización de esta proteína tanto en la fracción soluble, como en la pastilla. La proteína se expresó en un principio como cuerpos de inclusión (Figura 48), por lo que se modificaron las condiciones de expresión logrando obtener una proteína soluble.

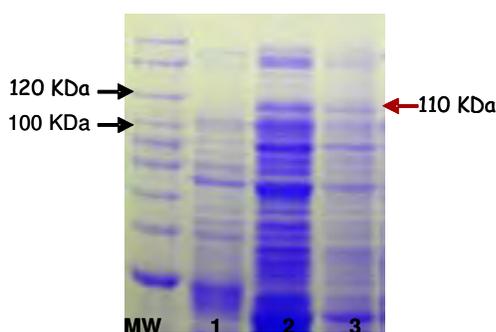


Figura 48. Expresión del dominio catalítico de la DsrS: 1. Control sin inductor, 2. Expresión en pellet y 3. Expresión de la proteína en la fracción soluble.

Mediante análisis de Western Blot con anticuerpos Anti-Trx (Anti-Tiorredoxina) se observó que la proteína localizada en la fracción insoluble aún presenta la tiorredoxina (Figura 49), mientras que la proteína expresada en la fracción soluble ya fue procesada en la región N-terminal perdiendo

esta proteína de fusión al ser transportada hacia el espacio periplásmico, de la misma manera que sucede con la enzima completa.

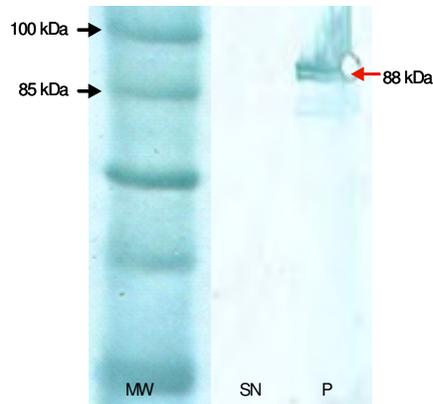


Figura 49. Análisis de western Blot utilizando anticuerpos Anti-Trx de la fracción soluble (SN) e insoluble (P), determinando la localización del dominio catalítico de la DsrS.

Se llevó acabo la caracterización de la actividad glucosiltransferasa de este dominio catalítico libre de las regiones N y C-terminal. Mediante zimograma observamos que este dominio no es capaz de producir polímero, sin embargo en análisis de los productos de reacción mediante HPLC se determinó que esta enzima posee actividad hidrolítica utilizando sacarosa como sustrato, aunque en una cantidad mínima (Figura 50). Estos resultados demuestran que esta enzima sigue siendo capaz de reconocer al sustrato e hidrolizarlo, mientras que su capacidad de producir polímero se elimina, estos resultados concuerdan con lo reportado por Moulis y col (2006), donde ellos reportan para al dominio catalítico de la DsrS una actividad del 0.14% respecto a la enzima completa.

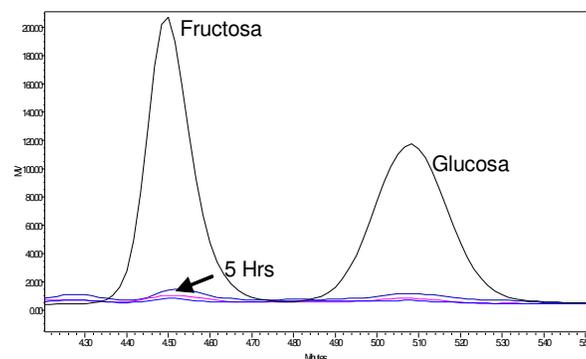


Figura 50. Determinación de la actividad hidrolítica del dominio catalítico de la DsrS mediante HPLC. Después de 5 hrs. de reacción utilizando sacarosa al 10% como sustrato.

Con la finalidad de analizar el fenómeno proteolítico del dominio catalítico, esta proteína se purificó mediante cromatografía de afinidad a níquel (Figura 51) y se analizó el perfil proteolítico de la enzima purificada mediante SDS-PAGE teñida con azul de coomasie, Western Blot utilizando anticuerpos Anti-His y Anti-DsrS (Figura 52). Al analizar los resultados del Western Blot utilizando anticuerpos Anti-DsrS, se observó que esta proteína presenta una forma derivada del procesamiento proteolítico.

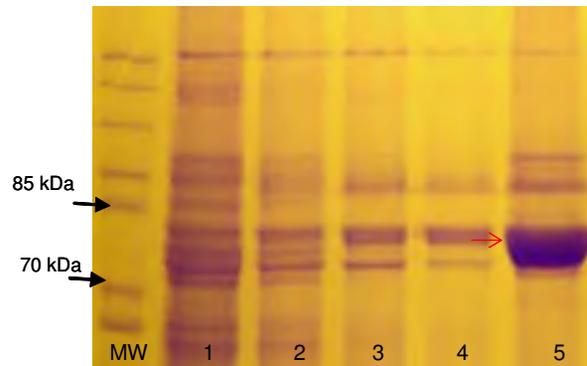


Figura 51. Perfil de proteínas en la purificación del dominio catalítico de la DsrS por cromatografía de afinidad a níquel. MW) Marcador peso molecular, 1) Barril TIM de la DsrS previo a la purificación, 2) Recirculado, 3-4) Lavados de la resina y 5) Elusión de la proteína de la resina.

Esta forma proteolizada no se observa en el ensayo utilizando anticuerpos Anti-His probablemente debido a que esta forma deriva de procesamiento proteolítico en la región C-terminal, perdiendo por tanto, la etiqueta de histidinas que nos permite caracterizar las formas proteolizadas que contienen esa región.

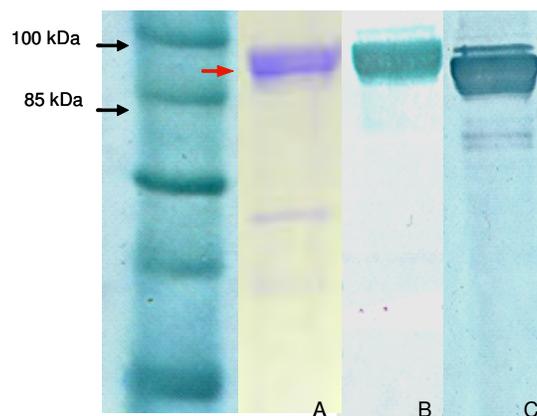


Figura 52. Perfil proteolítico del Barril TIM de la DsrS al momento de la purificación por cromatografía de afinidad a níquel. A) Azul de coomassie, B) Anti-His y C) Anti-DsrS

Para determinar si el dominio catalítico de la DsrS carente de las regiones N y C-terminal es susceptible a la proteólisis, se realizaron ensayos almacenando la proteína a 4°C, durante 75 días a pH 5.2 y 8.0, en presencia y ausencia de los inhibidores de proteasas (Complete y Pepstatina).

Al analizar las muestras mediante Western Blot utilizando los anticuerpos Anti-His (Figura 53) comparando la proteína recién purificada con la proteína almacenada, no se identificaron formas derivadas del procesamiento proteolítico, lo cual era de esperarse dado el resultado mostrado en la Figura 52.

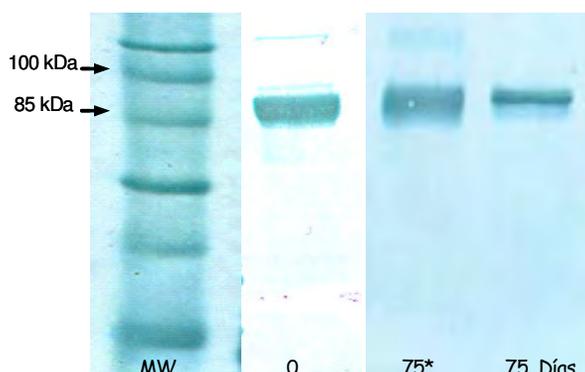


Figura 53. Comparación del procesamiento proteolítico del dominio catalítico de la DsrS al momento de la extracción y a los 75 días de almacenamiento a 4°C, mediante Western Blot utilizando anticuerpos Anti-His. (*) En presencia de inhibidores de proteasas.

Sin embargo, al analizar los resultados utilizando anticuerpos Anti-DsrS (Figura 54) se identifican varias formas derivadas del procesamiento, que no son observadas en el análisis anterior. Este resultado demuestra que esta proteína sigue sufriendo procesamiento proteolítico, al igual que la enzima completa incluso en presencia de inhibidores de proteasas.

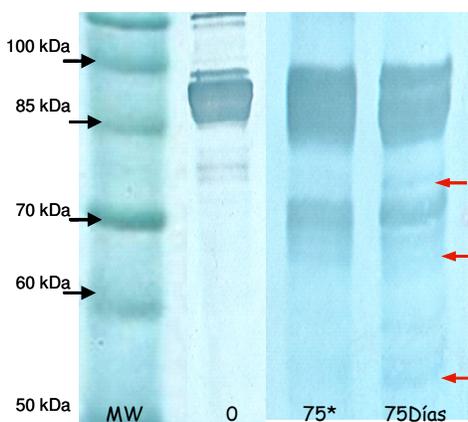


Figura 54. Comparación del procesamiento proteolítico del dominio catalítico de la DsrS al momento de la extracción y a los 75 días de almacenamiento a 4°C, mediante Western Blot utilizando anticuerpos Anti-DsrS. (*) En presencia de inhibidores de proteasas.

Estos resultados aportan nuevas evidencias acerca de la naturaleza autoproteolítica de la dextranasa DsrS. Al demostrar que el dominio catalítico de la DsrS purificado está sujeto al fenómeno de degradación autoproteolítica, concluimos que es el propio dominio catalítico el que contiene, además de la actividad glucosiltransferasa, una actividad proteolítica.

VI. DISCUSIÓN

Hasta el momento existe poca información respecto al procesamiento proteolítico de esta enzima, y la naturaleza de este procesamiento proteolítico está aún sin definir. Previo a este trabajo se han propuesto dos probables mecanismos como responsables de la degradación proteolítica de la dextranasa. El primero se sustenta en la actividad proteolítica reportada por Sánchez y col. (1999) en preparaciones de esta enzima. El segundo mecanismo propuesto es el de un procesamiento autocatalítico, apoyado por el hecho de que este procesamiento es independiente del fondo genético.

A lo largo de este trabajo se han discutido los hallazgos obtenidos que sustentan naturaleza autoproteolítica de esta enzima. Recientemente, Rupnik y cols. (2005) reportan un procesamiento proteolítico para TcdB de *Clostridium difficile*, la cual actúa de manera intracelular como una glucosiltransferasa específica para Rho GTPasas, Rac y Cdc42. Se ha propuesto que este procesamiento es dado por proteasas del propio *C. difficile* o bien por proteasas del hospedero heterólogo. Mediante ensayos de actividad proteolítica determinan que al igual que en la DsrS el procesamiento se favorece a pH 8.0 y que los inhibidores de proteasa no detienen este procesamiento, reportando que la pepstatina retarda débilmente la proteólisis. En el 2007 Reineke y cols. reportaron que este procesamiento está dado por un fenómeno autocatalítico el cual se inhibe por el uso de 1,2-epoxy-3-(p-nitrofenoxi) propano, el cual es un fuerte inhibidor de aspártico proteasas. Mediante ensayos de actividad proteolítica determinaron que la toxina B (TcdB) de *C. difficile* posee una función de aspártico proteasa, habiéndose reportado el motivo DXG (donde X puede ser S o T) como sitio activo de aspártico proteasas (Rao y cols. 1998), se identificó a lo largo de la secuencia de TcdB 3 de estos motivos en las posiciones 1665, 2001 y 2133 de la secuencia amoniocídica. Determinando a su vez que el motivo DSG (1665) es el sitio activo de la TcdB autocatalítica proteasas.

Con base en lo anterior nos propusimos realizar un análisis de la secuencia aminoácidica de la dextranasa buscando el motivo DXG ya mencionado. Se encontraron a lo largo de la secuencia de la enzima completa los motivos DTG(792) y DSG(1440) por lo que esto apoya fuertemente la conclusión dada en este trabajo sobre la naturaleza autocatalítica de esta enzima. Cabe mencionar, además que el motivo DTG se localiza dentro del dominio catalítico de esta enzima (domino con actividad glucosiltransferasa) lo que explicaría el porque la construcción pThioBarrilHis, que expresa el dominio catalítico de la DsrS, sigue presentando procesamiento proteolítico.

Con la información bibliográfica recopilada, así como la información obtenida mediante este proyecto, podemos responder afirmativamente a la pregunta planteada en los objetivos del proyecto; ya que puede concluirse que la dextransacarasa de *L. mesenteroides* es degradada tanto por un proceso de autocatálisis como por proteasas del hospedero (exógenas).

Sin embargo, ensayos que demuestren de manera contundente la naturaleza de este fenómeno autocatalítico en la dextransacarasa de *Leuconostoc mesenteroides* B512F son necesarios.

VII. CONCLUSIONES

- Se obtuvo una nueva herramienta, con la producción de anticuerpos Anti-DsrS específicos para la dextranasa (DsrS), que permiten una caracterización completa del fenómeno proteolítico de la DsrS.
- Durante la fermentación y extracción de la enzima los inhibidores de proteasas Complete (metalo, serino y cistein proteasas) y Pepstatina (Aspártico proteasas) no detienen el procesamiento proteolítico que sufre la DsrS recombinante en *E. coli*, observándose únicamente un retraso en la velocidad de dicho procesamiento. De igual modo el pH del buffer de extracción no tiene efecto en la actividad de estos inhibidores.
- El procesamiento proteolítico en la dextranasa resulta tanto en formas activas e inactivas, todas ellas derivadas del procesamiento de la enzima por ambos extremos de la proteína (amino y carboxilo terminal).
- La degradación proteolítica de la DsrS nativa y recombinante se incrementa con el tiempo de almacenamiento resultando en la degradación de las formas activas predominantes, y a largo plazo, dando lugar a una pérdida total de la actividad enzimática, como consecuencia de la proteólisis.
- El fenómeno proteolítico que sufre la DsrS nativa y recombinante se acelera con la temperatura, particularmente a pH 8.0.
- Las condiciones óptimas de almacenamiento de la DsrS, a las que se observa una mayor estabilidad frente a la proteólisis son: Temperatura 4°C y pH 5.2, el cual es también el pH óptimo para la actividad enzimática.
- En estudios de proteólisis controlada de la DsrS purificada se observó que el fenómeno proteolítico se mantiene, por lo que sugerimos fuertemente que el fenómeno proteolítico que experimenta la DsrS de *Leuconostoc mesenteroides* B512F es de naturaleza autocatalítica.

-
- La DsrS de *Leuconostoc mesenteroides* B512F posee en su secuencia aminoacídica dos sitios activos de aspártico proteasa, caracterizados por el motivo DXG (X: S o T), DTG(790) y DSG(1440) confiriéndole de esta manera una probable actividad autoproteolítica.
 - La actividad autocatalítica de la DsrS probablemente es un procesamiento procesivo donde pocos aminoácidos se eliminan de manera secuencial en ambos extremos de la proteína, resultando en cambios en cuanto al peso molecular y punto isoeléctrico de la proteína.
 - El dominio catalítico (Barril TIM de la DsrS) carente de los dominios N-terminal y C-terminal sigue sufriendo procesamiento proteolítico, por lo que se sugiere que, es el mismo dominio catalítico el responsable de la actividad proteolítica.
 - El fenómeno proteolítico que sufre la DsrS nativa y recombinante es debido a un procesamiento autoproteolítico inespecífico, el cual se ve acompañado por la acción de algunas proteasas del huésped heterólogo.

VIII. PERSPECTIVAS

Con la finalidad de estudiar y tratar de inhibir el procesamiento autoproteolítico que experimenta la dextranasa (DsrS) de *Leuconostoc mesenteroides* B512F proponemos como estrategias a futuro:

- Estandarizar la técnica de electroforesis de proteínas en doble dimensión de manera que se obtenga información clara y puntual del mapa proteolítico de la DsrS, esto es, en cuanto a los cambios de punto isoeléctrico y peso molecular de las diferentes proteínas derivadas de este procesamiento autocatalítico.
- Realizar estudios sobre la inhibición de la autoproteólisis de la DsrS utilizando un fuerte inhibidor de áspartico proteasas como es el 1,2-epoxy-3-(p-nitrofenoxi) propano (Reineke y col. 2007), el cual bloquea el sitio activo de este tipo de proteasas.
- Generar mutantes del gene *dsrS* y de la construcción pThioBarrilHis (Dominio catalítico de la DsrS) que carezcan de los motivos DXG (sitio activo de aspártico proteasas) con la finalidad de eliminar la actividad autocatalítica de la enzima.
- Analizar el fenómeno proteolítico de la mutantes mediante las técnicas descritas en este proyecto (SDS-PAGE teñidos con azul de Coomassie, zimogramas, Western blot utilizando anticuerpos Anti-Trx, Anti-DsrS y Anti-His)
- Realizar estudios de proteólisis de las mutantes mediante electroforesis de proteínas en doble dimensión, evaluando los cambios en el punto isoeléctrico y peso molecular de éstas.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alsop R.** (1983). Industrial production of dextrans. En: Progress in industrial microbiology. Vol. 18 pp1-43. Buschel, M.e. (Ed.) Elsevier Scientific Publishing Co., Amsterdan Holanda
- Arcot P. and Kim D.** (2002). Production of insoluble dextran using cell-bound dextransucrase of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-523. Carboh. Res. 337: 1529-1533
- Argüello-Morales M.** (2000). L'alternane-saccharase de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1355. structure primaire et synthèse d'oligosides. Tesis doctoral. L'Institut National des Sciences Appliquees de Toulouse, Francia
- Argüello-Morales M., Remaud-Simeon M., Pizzut S., Sarcabal P., Willemont R. and Monsan P.** (2000). Sequence analysis of the gene encoding alternansucrase, a sucrose glucosyltransferase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1355. FEMS Microbiol. Lett. 182: 81-85
- Argüello M., Sánchez-González M., Canedo M., Quirasco M., Farrés A. and López-Munguía A.** (2005). Proteolytic modification of *Leuconostoc mesenteroides* B512FMC dextransucrase. Antonie van Leeuwenhoek. 87: 131-141
- Berkelman T. and Stenstedt.** 2-D Electrophoresis principles and Methods. (1998). Handbooks from Amersham Biosciences
- Bozonnet S., Dols-Laffargue M., Fabre E., Pizzut S., Remaud-Simeone M., Monsan P. and Willemont R.** (2002). Molecular characterization of DsrE and α -1,2 linkage-synthesizing dextransucrase with two catalytic domains. Journal of bacteriology. 20: 5753-5761
- Chellapandian M., Larios C., Sánchez-González M. and López-Munguía A.** (1998). Production and properties of a dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* IBT-PQ isolated from 'pulque' a traditional Aztec alcoholic beverage. J. of Industrial Microbiology & Biotechnology. 21: 51-56
- Coligan John E., Dunn Ben M., Speicher David W., and Wingfield Paul T.** (2004). Currents and Protocols in protein science
- Del Moral-Ventura S. T.** (2004). Degradación proteolítica de la dextransacarasa de *Leuconostoc mesenteroides* B512F. Tesis de maestría. UNAM-IBT, Morelos, México
- Devulapalle K., Goodman S., Gao Q., Hemsley A. and Mooser G.** (1997). Knowledge-based model of a glucosyltransferase form oral bacterial group of mutans streptococci. Protein Sci. 6: 2489-2493
- Fabre E., Bozonnet S., Arcache A., Willemont R., Vignon M., Monsan P. and Remaud-Simeon M.** (2004). Role of the two catalytic domains of DrsE dextransucrase and their

involvement in the formation of highly α -1,2 branched dextran. *Journal of bacteriology*. 187: 296-303

Fabre E., Joucla G., Moulis C., Emond S., Richard G., Potocki-Veronese G., Monsan P. and Remaud-Simeon M. (2006) Glucansucrases of GH family 70: What are the determinants of their specificities?. *Biocatalysis and Biotransformation*. (1-2) 24: 137-145

Fernández-Tornero C., López R., García E., Giménez-Gallego G. and Romero A. (2001). A novel selenoid fold in the cell wall anchoring domain of the pneumococcal virulence factor LytA. *Nature structural biology*. 8:1020-1024

Fernández-Vázquez J. L. (2003). Aislamiento y expresión del gene que codifica para la dextranacarasa de *Leuconostoc mesenteroides* IBT-PQ. Tesis de maestría. UNAM-IBT, Morelos, México

Ferretti J., Gilpin L. and Russell R. (1987). Nucleotide sequence of a glucosyltransferase gene from *Streptococcus sobrinus* Mfe28. *J. Bacteriol.* 169: 4271-4278

Flambard B. and Juillard V. (2000). The autoproteolysis of *Lactococcus lactis* lactoceptina III affects its specificity towards β -casein. *Applied Environmental Microbiology*. 66:5134-5140

Funane K., Shiraiwa M., Hashimoto K., Ichishima E. and Kobayashi, M. (1993). An active-site peptide containing the second essential carboxyl group of dextranucrase from *Leuconostoc mesenteroides* by chemical modifications. *Biochem.* 32: 13696-13702

Funane K., Mizuno K., Takahara H. and Kobayashi M. (2000). Gene encoding a dextranucrase-like protein in *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64: 29-38

Funane K., Ishii T., Matsushita M., Hori K., Mizuno K., Takahara Y. and Kobayashi M. (2002). Water-soluble and water-insoluble glucans produced by *E. coli* recombinant dextranucrases from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. *Carbohydr. Res.* 334. 19-25

Giffard P., Simpson C., Milward C. and Jacques N. (1991). Molecular characterization of a cluster of at least two glucosyltransferase genes in *Streptococcus salivarius* ATCC 25975. *J. Gen. Microbiol.* 137: 2577-2593

Giffard P., Allen D., Milward C. Simpson C. and Jacques N. (1993). Sequence of the *gtfK* gene of *Streptococcus salivarius* ATCC 25975 and evolution of the *gtf* genes of oral Streptococci *J. Gen. Microbiol.* 139: 1511-1522

Giffard P. and Jacques N. (1994). Definition of fundamental repeating units in streptococcal glucosyltransferases glucan-binding regions and related sequences. *J. Dent. Res.* 73: 1133-1141

-
- Gilmore K., Rusell R. and Ferretti J.** (1990). Analysis of the *Streptococcus downei* *gtfS* gene, which specifies a glucosyltransferase that synthesizes soluble glucans. *Infect. Immun.* 58: 2452-2458
- Gómez-Gómez I.** Comunicación personal (2005)
- Gottesman S.** (1996). Proteases and their targets in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Genet.* 30: 465–506
- Hanada N., Isobe Y., Aizawwa Y., Katayama T., Sato S. and Inoue M.** (1993). Nucleotide sequence analysis of the *gtfT* gene from *Streptococcus sobrinus* OMZ176 *Infect. Immun.* 61: 2096-2103
- Honda O., Kato C. and Kuramitsu H.** (1990). Nucleotide sequence analysis of the *Streptococcus mutans* *gtfD* gene encoding the glucosyltransferase-S enzyme. *J. Gen. Microbiol.* 136: 2099-2105
- Ignatova Z., Enfors S., Hobbie M., Taruttis S., Vogt C. and Kashe V.** (2000). The relative importance of intracellular proteolysis and transport on the yield of the periplasmic enzyme penicillin amidase in *Escherichia coli*. *Enzyme and Microbial Technology.* 26: 165-170
- Izard J. and Kendall D.** (1994). Signal peptides: exquisitely designed transport promoters. *Mol. Microbiol.* 13: 765-773
- Jang J., Ko J., Kim E., Jang W., Kang J. and Yoo O.** (2001). Enhanced thermal stability of an alkaline protease, AprP, isolated from a *Pseudomonas* sp. by mutation at an autoproteolysis site, Ser-331. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 34:81-84
- Kato C., Nakano Y., Lis M. and Kuramitsu H.** (1992). Molecular genetic analysis of the catalytic site of *Streptococcus mutans* glucosyltransferases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 189: 1184-1188
- Kobayashi M and Matsuda K.** (1980). Characterization of multiple forms and main component of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512F. *Biochim. Biophys. Acta.* 614: 46-62
- Korakli Maher and Vogel Rudi F.** (2006). Structure/function relationship of homopolysaccharide producing glycosyltransferases and therapeutic potential of their synthesized glycans. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71: 790-803
- Kralj S., van Geel-Schutten G., Rahaoui H., Leer R., Faber E., van der Maarel M. and Dijkhuizen L.** (2002) Molecular characterization of a novel glucosyltransferase from *Lactobacillus reuteri* strain 121 synthesizing a unique, highly branched glucan with α -(1→4) and α -(1→6) glycosidic bonds. *Applied and environmental microbiology.* 68: 4283-4291

-
- Kunji E., Mierau I., Hagting A., Poolman B. and Konings W.** (1996). The proteolytic systems of acid lactic bacteria. *Antoine van Leeuwenhoek*. 70:187-221
- Laemmli U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227:680-685
- López-Munguía A., Plenc A., Remaud-Simeon M., Biton J., Michel J., Lang C., Paul F. and Monsan, P.** (1993). Production and purification of alternansucrase, a glucosyltransferase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1355, for the synthesis of oligoalternans. *Enzyme Microb. Technol.* 15: 77-85
- MacGregor A., Jesperen H. and Svensson B.** (1996). Circularly permuted α -amylase-type α/β -barrel structure in glucan-synthesizing glucosyltransferases. *FEBS Lett.* 398: 263-266
- Malten M., Hollmann R., Deckwer W. and Jahn D.** (2005). Production and secretion of recombinant *Leuconostoc mesenteroides* dextranucrase DsrS in *Bacillus megaterium*. *Biotechnology and Bioengineering*. 89: 206-218
- Mehvar Reza.** (2003). Recent trends in the use of polysaccharides for improved delivery of therapeutic agents: pharmacokinetic and pharmacodynamic perspective. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 4: 283-302
- Monchois V., Willemont R., Remaud-Simeon M., Croux C. and Monsan P.** (1996) Cloning and sequencing of a gene coding for a novel dextranucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 synthesizing only $\alpha(1-6)$ and $\alpha(1-3)$ linkages. *Gene* 182: 23-32
- Monchois V.** (1997). Étude des relations structure/fonction des dextrane-saccharases de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F & B-1299. Tesis doctoral. L'Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse, Francia.
- Monchois V., Remaud-Simeon M., Russell R., Monsan P. and Willemont R.** (1997). Characterization of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F dextranucrase (DSR-S) and identification of amino acid residues playing a key role in enzyme activity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48: 465-472
- Monchois V., Remaud-Simeon M., Monsan P. and Willemont, R.** (1998a). Cloning and sequencing of an extracellular dextranucrase (DSRB) from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 synthesizing only $\alpha(1-6)$ glucan. *FEMS Microbiol. Lett.* 159: 307-315
- Monchois V., Reverte A., Remaud-Simeon M., Monsan P. and Willemont R.** (1998b). Effect of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512F dextranucrase Carboxy-Terminal on dextran and oligosaccharide synthesis. *A and Env. Microb.* 64: 1644-1649
- Monchois V., Willemont R. and Monsan P.** (1999). Glucanases: mechanism of action and structure-function relationships. *Microbiol. Rev.* 23: 131-151

-
- Monsan P. and Paul F.** (1995). Enzymatic synthesis of oligosaccharides. *FEMS Microb. Rev.* 16 : 187-192
- Monsan P., Bozonnet S., Albenne C., Joucla G., Willemont R. and Remaud-Simeon M.** (2001). Homopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Int. Dairy. J.* 11: 675-685
- Mooser G., Hefta S., Paxton R., Shively J. and Lee T.** (1991). Isolation and sequence of an active-site peptide containing a catalytic aspartic acid from two *Streptococcus sobrinus* glucosyltransferases. *J. Biol. Chem.* 266: 8916-8922
- Moulis C., Arcache A., Escalier Pierre-Claude, Rinaudo M., Monsan P., Remaud-Simeon M. and Potocki-Veroneses G.** (2006a). High-level production and purification of a fully active recombinant dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. *FEMS Microbiol. Letter.* 261: 203-210
- Moulis C., Joucla G., Harrison D., Fabre E., Potocki-Veronese G., Monsan P. and Remaud-Simeone M.** (2006b). Understanding the polymerization mechanism of glycoside-hydrolase family 70 glucansucrases. *Journal of Biological Chemistry.* 28: 31254-31267
- Naessens M., Cerdobbel An., Soetaert W. and Vandamme E. J.** (2005). *Leuconostoc* dextransucrase and dextran: production, properties and applications. *Journal of chemical technology and biotechnology.* 80: 845-860
- Neely W. and Nott J.** (1962). Dextransucrase, an induced enzyme from *L. mesenteroides*. *Biochemistry.* 1: 1136-1140
- Neubauer H., Bauche A. and Mollet B.** (2003). Molecular characterization and expression analysis of the dextransaccharase DsrD of *Leuconostoc mesenteroides* Lcc4 in homologous and heterologous *Lactococcus lactis* cultures. *Microbiol.* 149: 973-982
- Nielse H., Engelbrecht J., Brunak S. and von Heijne G.** (1997). Identification of procaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavages sites. *Prot. Eng.*10:1-6
- Olvera-Carranza C., Fernández-Vázquez J., Ledesma-Candanoza L. and López-Munguía A.** (2007). Role of the C-terminal region of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* IBT-PQ in cell anchoring. *Microbiology.* 152:3994-4002
- Olvera-Carranza C.** Comunicación personal
- Ortiz-Soto M. E. y Rodríguez-Alegría M. E.** Comunicación personal
- Perler F., Xu M., and Paulus H.** (1997) Protein splicings and autoproteolysis mechanism. *Cuurent Opinon in Chemical Biology.* 1:292-299
- Qian X., Guan C. and Guo H-C.** (2003). A dual role for an aspartic Acid in glycosylasparaginase autoproteolysis. *Elsevier Science.* 11: 997-1003

-
- Quirasco M., López-Munguía A., Remaud-Simeon M., Monsan P. and Farrés A.** (1999). Induction and transcription studies of dextransucrase gene in *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512F. *Applied and Environmental Microbiology*. 12: 5504-5509
- Rao M., Tanksale A., Ghatge M. and Deshpande V.** (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 597-635
- Reineke J., Tezner S., Rupnik M., Koschinski A., Hasselmayer O., Schratzenholz A., Schild H. and von Eichel-Streiber C.** (2007). Autocatalytic cleavage of *Clostridium difficile* toxin B. *Nature*. 446: 415-419
- Remaud-Simeon M., López-Munguía A., Elenc V., Paul F. and Monsan P.** (1994). Production and use of glycosyltransferase of *Leuconostoc mesenteroides* B-1299 for the sintesis of oligosaccharides containing α -(1,2) linkages. *Appl. Biochem. Biotech.* 44: 101-117
- Remaud-Simeon M., Willemont R., Sarçabal P., Potocki de Montalk G. and Monsan P.** (1999). Glucansucrases: molecular engineering and olisaccharides synthesis. *Journal of Molecular Catalysis*. 10: 117-128
- Rupnik M., Pabst S., Rupnik M., von Eichel-Streiber C., Urlaub H. and Söling H-D.** (2005). Characterization of the cleavage site and function of resulting cleavage fragments alter limited proteólisis of *Clostridium difficile* toxin B (TcdB) by host cells. *Microbiology*. 151: 199-208
- Rusell R., Gilpin M., Musaka H. and Dougan G.** (1987). Characterization of glucosyltransferase expresed from a *Streptococcus sobrinus* gene cloned in *E. coli*. *J. Gen. Microbiol.* 133: 935-944
- Sánchez-González M.** (1999). Origen y propiedades de las diversas formas observadas de la *Leuconostoc mesenteroides* B512FMC. Tesis doctoral. UNAM-IBT, Morelos, México.
- Sánchez-González M, Alagón A, Rodríguez-Sotrés R, López-Munguía A.** (1999). Proteolytic processing of dextransucrase of *Leuconostoc mesenteroides*. *FEMS Microbiology Letters*. 181: 25-30
- Savijoki K., Ingmer H. y Varmanen P.** (2006). Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol*
- Shimamura A., Nakano, Y., Musaka, H. y Kuramitsu, H.** (1994). Identification of amino-acid residues in *Streptococcus mutans* glucosyltransferases influencing the structure of the glucan product. *J. Bacteriol.* 176: 4845-4850.
- Shiroza T., Ueda, S. y Kuramitsu, H.** (1987). Sequence analysis of the *gtfB* gene from *Streptococcus mutans*. 169: 4263-4270
- Sidebotham R.** (1974). Dextran. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 30: 371-444

-
- Simpson C., Cheetham, N., Giffard, P. y Jacques, N.** (1995a). Four glucosyltransferases, GTFJ, GTFK, GTFL, and GTFM from *Streptococcus salivarius* ATCC 25975. Microbiol. 141: 1451-1460
- Simpson C., Giffard, P. y Jacques.** (1995b). *Streptococcus salivarius* ATCC 25975 possesses at least two genes coding for primer independent glucosyltransferases. Infect. Immun. 63: 609-621
- Sumner J. y Howell S.** (1935). A method for determination of saccharase activity. J. Biol. Chem. 108:51-54
- Tanriseven A. y Robyt, J.** (1992). Inhibition of dextran synthesis by acceptor reactions of dextransucrase, and the demonstration of separate acceptor binding site. Carbohydr. Res. 225: 321-329
- Tanriseven A. y Robyt, J.** (1993). Interpretation of dextransucrase inhibition at high sucrose concentrations. Carbohydr. Res. 245: 97-104
- Tsumori H., Minami T., Kuramitsu H.** (1997). Identification of esencial aminoacids in the *Streptococcus mutans* glucosyltransferases. J. Bacteriology. 179: 3391-3396
- Ueda S., Shiroza, T. y Kuramitsu, H.** (1988). Sequence analysis of the *gtfC* gene from *Streptococcus mutans* GS 5. Gene. 69: 101-109
- Vickerman M., Sulavik, M. Minick, P. y Clewell D.** (1996). Changes in the carboxy-terminal repeat region affect extracelular activity and glucan products of *Streptococcus gordonii* glucosyltransferase. Infect.Immun. 64: 5117-5128
- Vickerman M., Sulavik, J., Nowak, J., Gardner, M., Jones, C. y Clewell, D.** (1997). Nucleotide sequence analysis of the *Streptococcus gordonii* glucosyltransferase gene, *gtfG*. DNA Seq. 7:83-95
- Von Heijne G. y Abrahmsen, L.** (1989). Species specific variation in signal peptide design. Implications for protein secretion in foreign hosts. FEBS Lett. 244: 439-446
- Wilke-Douglas M., Perchorowicz, J. T., Houck y Thomas, B. R.** (1989). Methods and compositions of altering physical characteristics of fruit products. Us patente WO89/12386

Agradecimientos...

Quisiera externar en estas líneas mi profundo agradecimiento a:

Agustín (Dr. Agustín López-Munguía) por permitirme formar parte de su grupo de investigación, por su apoyo en todo momento, su paciencia y la gran calidez humana que lo caracteriza.

De igual a Clarita (Dra. Clarita Olvera) por aceptar guiarme en esta etapa académica, por su inigualable apoyo en todos los sentidos, su paciencia, cariño y su gran amistad.

Al Dr. Alejandro Alagón y a la Dra. Gloria Saab, miembros de mi comité tutorial por sus valiosas aportaciones al desarrollo de este proyecto.

Al Dr. Miguel Ángel Cevallos, Dra. Elda Guadalupe Espin, Dra. Isabel Gómez y Dra. Maricarmen Quirasco, miembros de comité de revisión de tesis por su paciencia, apoyo y valiosos comentarios que permitieron enriquecer este escrito.

A la Dra. Isabel Gómez y al QFB Sabino Pacheco por el apoyo técnico en la inmunización de conejos para la producción de anticuerpos Anti-DsrS, así como la aplicación y desarrollo de las técnicas de ELISA Y Western Blot.

A Felipe Olvera por el apoyo técnico en la limpieza y purificación de los anticuerpos policlonales Anti-DsrS desarrollados en este trabajo.

A la Dra. Victoria Pando y M en C Ramón De Anda por el apoyo técnico en las herramientas de electroforesis bidimensional.

A la M en C Ma. Elena Rodríguez A. por su valioso apoyo en las herramientas y técnicas de biología molecular, especialmente en el desarrollo de la construcción pThioBarrilHis, correspondiente dominio catalítico de la DsrS.

A todo el personal de la planta piloto especialmente a Mario Caro por el apoyo técnico.

Al personal del bioterio de este instituto, especialmente a Ricardo Mondragón por su ayuda en el manejo y cuidado de animales de laboratorio, específicamente conejos.

A Juan Manuel Hurtado y Alma Martínez de la unidad de computo por el apoyo técnico proporcionado.

A Jalil Saab y Gloria Villa de la unidad de docencia por el inmenso apoyo otorgado en la realización de trámites.

A la unidad de biblioteca, especialmente a Shirley Ainsworth por su ayuda en la obtención de recursos bibliográficos durante el desarrollo de este proyecto.

A la unidad de síntesis y secuenciación de ADN, especialmente a Jorge Yanez y Santiago Becerra por sus servicios.

A Aurelia Ocampo, Judith Uribe y Fernando González por su asistencia técnica durante el desarrollo de este proyecto en el grupo del Dr. Agustín López, así como a mis compañeros del grupo de investigación. Así como a Verónica Aldama por el apoyo secretarial.

A mis grandes amigas Angela y Sandy, a mi "Compa" Pavel por todo su apoyo, por quererme, aceptarme como soy y hacer de mi una mejor persona. Gracias por todas esas aventuras y viajes que compartimos, son recuerdos maravillosos que siempre me hacen sonreír.

A Male, Alfredo y su familia por arroparme en mi estadía en Cuernavaca, por escucharme y por brindarme su amistad y cariño en todo momento.

A mis compañeros de generación y grandes amigos: Itzel, Sabino, Mary y Miguel por todos los buenos y malos momentos juntos, por su invaluable cariño, apoyo y especialmente por esas idas a bailar salsa, así como esas buenas fiestas que tuvimos.

A todas aquellas personas que me honraron con su amistad a lo largo de mi estancia en el IBT, que me dieron su cariño y me hicieron sonreír.

Finalmente quiero externar mi gratitud a las personas más importantes en mi vida, las cuales constituyen mi pilar, motor y razón de ser. Dedico este trabajo a mi familia.

A mis hermanos Leonor y Jonathan por su cariño, apoyo y paciencia. Por aguantarme y quererme tantos años, en las buenas y en las malas. Por darme su cariño aún cuando no lo merezca. Gracias por respetar y respaldar todas mis decisiones.

A mis sobrinos Alí y Diego, que son mi razón para seguir adelante, no obstante me vuelven loca los adoro con toda mi vida.

A mi mamá Sra. Maria Mojica Gallegos, por su gran fortaleza, por permitirme realizar lo que me gusta y apoyar mis decisiones. Por guiar cada uno de mis pasos y sostenerme en todo momento. Por el gran amor y ejemplo que siempre me ha dado. Por enseñarme el significado de FAMILIA.

A mi papá Sr. Heriberto Mellado López†, por darme siempre su cariño y apoyo incondicional. Por enseñarme con su ejemplo el significado de ser un hombre honrado, trabajador y dedicado a su familia. Por ser un excelente padre y siempre estar ahí cuando te necesite. Por enseñarme a volar y amarme tal cual soy sin importar mis errores y defectos. Te quiero mucho y te extraño más. Se que allá en donde estas...ésta orgulloso de mi.

Es muy difícil para mi externar en estas pequeñas líneas el inmenso agradecimiento y cariño que tengo hacia todas aquellas personas que formaron parte de mi vida en esta pequeña gran aventura. Me conocen muy bien y saben que soy olvidadiza, así que, si por error omito a alguien saben que no es de manera conciente.

A pesar de las dificultades fue maravilloso estar aquí y formar parte del IBT, no solo crecí académicamente, las enseñanzas de vida fueron las mejores enseñándome acerca del valor y la fortaleza. Me siento inmensamente dichosa por haber conocido a tantas personas que enriquecieron mi vida de diferentes formas. A todos mi eterno cariño y mil gracias....

Erika Mellado Mojica