



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE QUÍMICA

“EXPRESIÓN Y CARACTERIZACIÓN POR  
MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS (RMN) DE LA  
DEFENSINA 4”

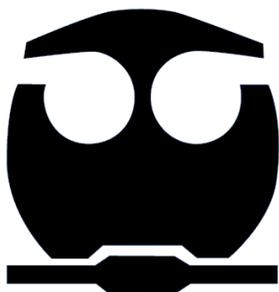
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

Q U Í M I C O

P R E S E N T A

DAVID FLORES SOLÍS



MÉXICO, D. F.

2010



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Profesor: José Federico del Río Portilla

**VOCAL:** Profesor: Rogelio Rodríguez Sotres

**SECRETARIO:** Profesor: Ernesto Sánchez Mendoza

**1er. SUPLENTE:** Profesor: Laura Carmona Salazar

**2° SUPLENTE:** Profesor: Alicia Acely Garza García

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:** LABORATORIO 1 DEL DEPARTAMENTO DE

BIOQUÍMICA Y LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR, INSTITUTO DE QUÍMICA UNAM

**ASESOR DEL TEMA:** **DR. JOSÉ FEDERICO DEL RÍO PORTILLA**

**SUPERVISOR TÉCNICO:** **DRA. ALICIA ACELY GARZA GARCÍA**

**SUSTENTANTE:** **DAVID FLORES SOLÍS**

Tratar de ser un humano agradecido es algo importante para mí. Por ello, esta página que va dirigida a todas las personas que con sus acciones y presencia durante mi paso por la Facultad de Química y la realización de mi tesis de licenciatura, me permiten disfrutar diciéndoles ¡Gracias!

Quiero comenzar agradeciendo a la Universidad Nacional Autónoma de México y a su Facultad de Química por haberme brindado la gran oportunidad de desarrollo personal al estudiar una licenciatura en esta casa de estudios. Quedo profundamente agradecido de todas las personas que hacen de esta Universidad un gran motor para el desarrollo de nuestro país.

Existen varios factores para la consecución de esta tesis, uno de los más importantes fue mi familia. Mis padres siempre han procurado brindarme el apoyo, cariño y sabiduría que poseen para ayudarme a enfrentar la vida. Jamás podría terminar de agradecerles todos los esfuerzos que han realizado para que disfrute plena y responsablemente mi vida. Eternamente agradecido ustedes mis padres: Alicia Solís y Ernesto Flores. Mi hermano es otra persona que ha hecho siempre más agradable mi existencia. Todos los juegos y risas que hemos compartido, desde niños hasta el día de hoy, siempre me traen una agradable y reconfortante sonrisa, como en este preciso instante. Gracias a los tres por llenar mi vida de alegría y por quererme tanto.

Otro par de personas muy importantes para mí son Acely y Fede. Ambos han guiado y confiado en mí y en mi trabajo. Me honra conocer a personas como Acely y Fede quienes son unos de los principales responsables de que pueda escribir esta página. Ambos son más que mis asesores. A Acely quiero agradecerle todo el tiempo que se toma para explicarme las cosas que realizamos en el laboratorio. Es una enorme alegría colaborar contigo y también que seas mi amiga.

Siempre recordaré el día que pedí la oportunidad de trabajar en el grupo de investigación del Dr. Federico del Río, sin conocerme a la perfección me concedió la oportunidad de demostrar mi trabajo. Comencé a trabajar en biología molecular bajo la guía y ayuda de Belén, quien a la postre se convirtió en mi primer amiga en ese

laboratorio. Ese día marca un giro en mi vida, un giro positivo y con el cual estoy más que satisfecho ¡Estoy feliz de haberlo dado! Por ese y muchos otros días buenos que he pasado en el laboratorio BQ-1, por todas las palabras, la guía académica, la confianza en mí y el apoyo te agradezco Fedé. Para ti toda mi admiración, respeto y cariño.

En el tiempo que pase y disfruté en la facultad de química conocí a muchas personas. Con algunos de ellos he formado lazos de amistad. La mayoría de mis amigos provienen del grupo 5 de la generación 2005: Ania, Bea, Erick, Goretti, José, Luz del Carmen, Luz R., Lylian, Marco, Nury, Oscar, Regina, Roberto, Sara, Verónica, Zaine y mis asesores de Química General Iván y Karina. Otros se incorporaron a lista de amigos entrañables conforme los semestres pasaban: Ethelia, Brenda, Gaby, Paulina, Meche, Victor, Marisol y Midori. Los químicos de mi generación Jorge, Daniela, Rodrigo, Martha, Alonso, Rogerio, Laura, Marco C... Con todos forje una buena amistad. Con algunos otros logré lazos aún más fuertes y los considero mis hermanos: Mariana, Raquel y Ricardo. Todos son parte de mí y agradezco todo lo que hemos compartido.

Finalmente quiero agradecer al laboratorio de Biología Molecular y al Laboratorio 1 del departamento de Bioquímica ambos pertenecientes al Instituto de Química. A todas las personas que conforman los grupos de trabajo que dan vida a estos laboratorios. A todos los “amigazos” del “BQ-1”: Alma, Amed, Angélica, Belén, Enrique, Fedé, Roger, Ernesto L., Ernesto S. y el Dr. Héctor Barrios.

De todos quedo muy agradecido.

David Flores Solís, México D.F. 16 de enero de 2010

Esta tesis fue realizada gracias al apoyo proporcionado por el consejo nacional de ciencia y tecnología (CONACYT) mediante el proyecto 59297.

CONTENIDO	PÁGINA
<b>1 INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 HIPÓTESIS.....</b>	<b>2</b>
<b>1.2 OBJETIVOS.....</b>	<b>2</b>
<b>2 MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1 DEFENSINAS .....</b>	<b>3</b>
2.1.1 <i>LA DEFENSINA 4(DEF4).....</i>	<i>4</i>
<b>2.2 PÉPTIDOS Y PROTEÍNAS .....</b>	<b>5</b>
2.2.1 <i>ARQUITECTURA PROTEICA.....</i>	<i>6</i>
2.2.2 <i>SÍNTESIS DE PROTEÍNAS.....</i>	<i>8</i>
<b>2.3 PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES .....</b>	<b>9</b>
2.3.1 <i>PLÁSMIDOS.....</i>	<i>10</i>
2.3.2 <i>TRANSFORMACIÓN GENÉTICA .....</i>	<i>10</i>
2.3.3 <i>EL SISTEMA T7 PARA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES.....</i>	<i>11</i>
2.3.4 <i>ENRIQUECIMIENTO ISOTÓPICO .....</i>	<i>13</i>
2.3.5 <i>CUERPOS DE INCLUSIÓN Y PLEGAMIENTO IN VITRO .....</i>	<i>14</i>
<b>2.4 PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.....</b>	<b>15</b>
2.4.1 <i>CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD METAL QUELATO.....</i>	<i>15</i>
2.4.2 <i>CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA (HPLC) DE PÉPTIDOS Y PROTEÍNAS.....</i>	<i>16</i>
<b>2.5 RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR .....</b>	<b>17</b>
2.5.1 <i>LA UTILIDAD DE LA PROPIEDADES NUCLEARES.....</i>	<i>17</i>
2.5.2 <i>DESPLAZAMIENTO QUÍMICO .....</i>	<i>20</i>
2.5.3 <i>RMN DE PROTEÍNAS.....</i>	<i>20</i>
<b>2.6 MODELADO MOLECULAR POR HOMOLOGÍAS.....</b>	<b>22</b>
<b>3 DISEÑO EXPERIMENTAL .....</b>	<b>24</b>
<b>3.1 CONSTRUCCIÓN DEL PLÁSMIDO PARA LA OBTENCIÓN DE LA DEF4.....</b>	<b>24</b>
<b>3.2 EXPRESIÓN EN E. COLI DE LA DEF4 .....</b>	<b>26</b>
3.2.1 <i>EXPRESIÓN EN MEDIO LURIA BERTANI.....</i>	<i>27</i>
3.2.2 <i>ENRIQUECIMIENTO ISOTÓPICO .....</i>	<i>27</i>

<b>3.3 PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE.....</b>	<b>29</b>
3.3.1 SOLUBILIZACIÓN DE CUERPOS DE INCLUSIÓN .....	29
3.3.2 CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD METAL QUELATO.....	29
3.3.3 DESNATURALIZACIÓN Y PLEGAMIENTO.....	29
3.3.4 CORTE DE LA PROTEÍNA DE FUSIÓN .....	31
3.3.5 PURIFICACIÓN UTILIZANDO HPLC.....	31
<b>3.4 CARACTERIZACIÓN .....</b>	<b>32</b>
3.4.1 MASAS Y PLEGAMIENTO .....	32
<b>3.5 ANÁLISIS POR RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR .....</b>	<b>32</b>
3.5.1 ANÁLISIS POR RMN .....	32
<b>4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>34</b>
<b>4.1 PRODUCCIÓN LA DEF4 .....</b>	<b>34</b>
4.1.1 MONITOREO DE LAS EXPRESIONES.....	34
4.1.2 DEF4 SIN ENRIQUECER.....	34
4.1.3 CONDICIONES PARA EXPRESIÓN EN MEDIO MÍNIMO.....	35
4.1.4 LISIS CELULAR Y SOLUBILIZACIÓN DE LOS CUERPOS DE INCLUSIÓN .....	38
<b>4.2 PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE.....</b>	<b>39</b>
4.2.1 CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD METAL QUELATO.....	39
4.2.2 DESNATURALIZACIÓN Y PLEGAMIENTO IN VITRO.....	40
4.2.3 PURIFICACIÓN POR HPLC.....	41
<b>4.3 CARACTERIZACIÓN .....</b>	<b>43</b>
4.3.1 ESPECTROMETRÍA DE MASAS.....	43
4.3.2 MÁXIMO DE ABSORCIÓN EN LA REGIÓN DE UV.....	44
<b>4.4 RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR .....</b>	<b>44</b>
4.4.1 MODELAJE POR HOMOLOGÍA DE LA DEF4.....	48
<b>4.5 RESUMEN DE RESULTADOS .....</b>	<b>49</b>
<b>5 CONCLUSIONES.....</b>	<b>51</b>
<b>6 REFERENCIAS Y BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>52</b>
<b>7 APÉNDICES.....</b>	<b>I</b>
<b>APÉNDICE A PROTOCOLOS DE EXPRESIÓN EN MEDIO MÍNIMO .....</b>	<b>I</b>

APÉNDICE B	COMPOSICIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO .....	V
APÉNDICE C	AMINOÁCIDOS EN LA NATURALEZA .....	IX
APÉNDICE D	PROTOCOLOS COMPETENCIA Y TRANSFORMACIÓN .....	X
APÉNDICE E	ESPECTRO DE MASAS DE <sup>13</sup> C, <sup>15</sup> N-DEF4 .....	XII
APÉNDICE F	PROTOCOLO PARA GELES DE ELECTROFORESIS .....	XIII
APÉNDICE G	DISOLUCIONES AMORTIGUADORAS PARA LA DEF4 .....	XIV
APÉNDICE H	SISTEMAS DE ESPÍN LOS 20 A-AMINOÁCIDOS .....	XV

<b>FIGURA</b>	<b>PÁGINA</b>
Figura 2.1. Secuencia de aminoácidos de la DEF4 .....	4
Figura 2.2. Esquema general de un $\alpha$ -aminoácido. <sup>(23)</sup> .....	5
Figura 2.3. El enlace peptídico. ....	5
Figura 2.4. Puentes disulfuro.....	7
Figura 2.5. Niveles estructurales de proteínas .....	8
Figura 2.6 Biosíntesis de proteínas.....	9
Figura 2.7. Recombinación genética .....	10
Figura 2.8. Transformación genética .....	11
Figura 2.9. Modelo general de regulación de transcripción mediante el uso del operador lac e IPTG .....	12
Figura 2.10. Mecanismo de expresión de una proteína recombinante mediante el sistema T7 .....	12
Figura 2.11. Purificación por cromatografía de afinidad metal quelato .....	16
Figura 2.12. El efecto Zeeman de un núcleo con espín $I=\frac{1}{2}$ . ....	19
Figura 3.1. Esquema de la construcción utilizada para la obtención de la DEF4 .....	26
Figura 3.2. Métodos y medios de cultivo empleados en la expresión de la DEF4 .....	28
Figura 3.3. Estrategia de plegamiento de la proteína de fusión.....	30
Figura 3.4. Proceso general para la determinación estructural de proteínas por RMN.....	32
Figura 4.1. Gel de SDS-PAGE de la expresión en medio LB.....	35
Figura 4.2. Monitoreo de la expresión en medio mínimo concentrando células .....	36

Figura 4.3. Monitoreo de la expresión en medio mínimo PG .....	38
Figura 4.4. Cromatogramas y gradiente utilizado en la purificación por HPLC de la proteína de fusión .....	42
Figura 4.5. Espectro de $^1\text{H}$ correspondiente a la muestra de DEF4 sometida a la reacción de plegamiento .....	45
Figura 4.6. Espectro $^{15}\text{N}$ -HSQC de la DEF4 .....	46
Figura 4.7. Expansión del espectro NOESY de la DEF4 .....	47
Figura 4.8. Alineamiento de la secuencia primaria de la DEF4 con la secuencia primaria de la proteína plantilla, la defensina MGD-1 .....	48
Figura 4.9. (a) Modelo por homología de la DEF4, calculado con Modeller <sup>(55)</sup> (b) Estructura tridimensional de la defensina MGD-1. ....	49
Figura 7.1. Espectro de masas de la DEF4 doblemente enriquecida en isótopos de $^{13}\text{C}$ y $^{15}\text{N}$ .....	XII

<b>TABLA</b>	<b>PÁGINA</b>
Tabla 2.1. Propiedades nucleares de isótopos selectos.(42) .....	19
Tabla 3.1. Secuencia de ADN y oligonucleótidos diseñados para su síntesis por el método de ensamblaje por PCR .....	24
Tabla 3.2. Condiciones experimentales y ciclos de temperatura para sintetizar el gen de DEF4 por PCR.....	25
Tabla 4.1. Resultados del análisis por espectrometría de masas a los muestras aisladas por HPLC. ....	43
Tabla 4.2. Calculo del rendimiento por UV. El cálculo se realizó con coeficiente de extinción molar obtenido en el servidor ExPASy.(53).....	44
Tabla 7.1. Los 20 aminoácidos comunes en la naturaleza. La tabla muestra la abreviatura (de una y tres letras) y la clasificación del grupo R acuerdo a su naturaleza química.(23).....	IX

<b>ABREVIATURA</b>	<b>SIGNIFICADO</b>
<b>DEF4</b>	Defensina 4
<b>TEV</b>	Proteasa Tobacco Etch Viruse
<b>ADN</b>	Ácido <b>D</b> esoxirribonucleico
<b>ARN</b>	Ácido <b>R</b> ibonucleico
<b>IPTG</b>	Isopropil $\beta$ -tiogalactopiranosido
<b>RMN</b>	<b>R</b> esonancia <b>M</b> agnética <b>N</b> uclear
<b>kDa</b>	Kilo Dalton; Da = 1g/mol
<b>MHz</b>	Mega Hertz
<b>B<sub>0</sub></b>	Campo magnético cero
<b><sup>1</sup>H<math>\alpha</math></b>	Protón alfa
<b><math>\nu</math></b>	Frecuencia
<b>TOCSY</b>	<b>T</b> otal <b>C</b> orrelation <b>S</b> pectroscopy
<b>NOESY</b>	<b>N</b> uclear <b>O</b> verhauser <b>E</b> ffect <b>S</b> pectroscopy
<b>HSQC</b>	<b>H</b> eteronuclear <b>S</b> ingle- <b>Q</b> uantum <b>C</b> orrelation
<b><sup>15</sup>NHSQC</b>	<b>H</b> eteronuclear <b>S</b> ingle- <b>Q</b> uantum <b>C</b> orrelation <b><sup>15</sup>N</b> y <b><sup>1</sup>H</b>
<b>HPLC</b>	Cromatografía líquida de alta eficiencia

## 1 INTRODUCCIÓN

Las defensinas son antibióticos de naturaleza proteica capaces de eliminar varias clases de microorganismos. Estos péptidos se descubrieron a mediados de la década de los ochentas<sup>(1)</sup> y representan una de las familias de péptidos con actividad antimicrobiana más grande, importante y ampliamente distribuida. Las defensinas son una de las respuestas inmunes más comunes en la naturaleza,<sup>(2)</sup> ya que se han identificado y caracterizado tanto en animales vertebrados e invertebrados, como en plantas y hongos.<sup>(3)</sup> La amplia distribución de estos péptidos infiere una importancia del papel evolutivo que han jugado en la diversificación de los organismos multicelulares.<sup>(3; 4)</sup> Adicionalmente, se han propuesto posibles beneficios biotecnológicos utilizando defensinas,<sup>(5)</sup> por ejemplo como moléculas antitumorales.<sup>(6)</sup>

Se ha encontrado que las defensinas guardan similitud estructural con algunas toxinas bloqueadoras de canales iónicos.<sup>(5; 7; 8)</sup> Estudios de filogenética molecular y topología de genes sugieren que las toxinas bloqueadoras de canales iónicos pudieron evolucionar a partir de las defensinas. Para verificar si esto es factible, es crucial demostrar que una defensina es capaz de bloquear canales iónicos. La defensina 4 (DEF4) del alacrán *Androctonus Australis* ha sido identificada como un buen candidato para llevar a cabo este experimento (Rodríguez de la Vega, R, comunicación personal). El análisis estructural debe contar con la proteína correctamente plegada para identificar los elementos estructurales y químicos involucrados en la actividad biológica de esta molécula. El estudio que aquí se presenta tiene como objetivo el desarrollo de una técnica para expresar en *Escherichia coli* y purificar DEF4 recombinante.

En esta tesis se reportan los experimentos realizados para la expresión, purificación, plegamiento oxidativo *in vitro*, marcaje isotópico, caracterización y estudios preliminares de RMN de la DEF4.

Este trabajo es el preámbulo del estudio estructural de defensinas que permita comprobar y explorar la actividad química de estos péptidos, potenciales grupos de aplicaciones biotecnológicas.

## **1.1 HIPÓTESIS**

La DEF4 podrá ser sobre expresada en la bacteria *E. coli*, aislada de cuerpos de inclusión y plegada utilizando el par redox cistina/cisteína para promover la formación de los puentes disulfuro nativos y consecuentemente el arreglo tridimensional de la estructura nativa.

## **1.2 OBJETIVOS**

- Expresar DEF4 recombinante en *E. coli*.
  - Establecer las condiciones experimentales para la expresión de la DEF4 en medio LB, medio mínimo PG y en medio mínimo M9 con la estrategia de reducción de volumen.
  - Identificar los beneficios de los métodos utilizados para incorporar isótopos activos en RMN en la DEF4.
- Aislar y purificar el péptido del sistema productor.
  - Aislar el péptido de cuerpos de inclusión.
  - Purificar por técnicas cromatográficas.
- Realizar el plegamiento oxidativo *in vitro* de la DEF4 para obtener la proteína en su conformación nativa.
  - Comprobar el plegamiento mediante técnicas espectroscópicas (RMN)

## 2 MARCO TEÓRICO

### 2.1 DEFENSINAS

Las defensinas son una de las familias de péptidos antimicrobianos más grande, e importante de la naturaleza.<sup>(9; 10)</sup> A mediados de la década de los ochentas comenzaron a explorarse las características y propiedades de este grupo de péptidos bactericidas.<sup>(1)</sup> En la actualidad, existen más de 1000 trabajos publicados al año sobre este tema.<sup>(11)</sup>

En numerosos organismos multicelulares las defensinas constituyen la primera línea de defensa en contra de microorganismos invasores.<sup>(4; 10; 12)</sup> Varios autores han señalado su importancia en la vida temprana; como el más simple, pero eficiente mecanismo de resistencia contra la colonización microbiana y, hoy en día, se investiga sobre las posibles aplicaciones biotecnológicas como péptidos antitumorales.<sup>(5; 6)</sup>

Debido a su amplia distribución en la naturaleza, a las similitudes entre las distintas defensinas y al descubrimiento de péptidos homólogos se considera que las defensinas han desempeñado un papel muy importante en la evolución de los organismos multicelulares<sup>(4; 13; 14; 15; 16)</sup> y existe gran interés en entender los procesos evolutivos que llevaron a su aparición y diversificación.<sup>(16)</sup>

Se han encontrado similitudes en la actividad biológica de las defensinas y de las toxinas bloqueadoras de canales iónicos,<sup>(17; 18; 19)</sup> por ejemplo, se ha demostrado que algunas toxinas tienen un efecto antibiótico *in vitro* y que las defensinas son capaces de interactuar con algunos canales iónicos. Rodríguez de la Vega y colaboradores han realizado comparaciones que revelaron semejanzas entre estos dos grupos de péptidos a nivel de secuencia primaria, estructura tridimensional y de organización de genes.<sup>(7; 8; 20)</sup> Consecuentemente, estos estudios han conducido a correlacionar el origen de ambos grupos.<sup>(7)</sup> Se ha propuesto la existencia de un grupo ancestral común entre defensinas y toxinas bloqueadoras de canales iónicos. En este grupo ancestral se encuentra la DEF4.

### 2.1.1 LA DEFENSINA 4(DEF4)

La DEF4 pertenece a un grupo de péptidos primitivos que se presume dieron lugar a las defensinas clásicas y a las toxinas bloqueadoras de canales iónicos. El estudio de esta defensina mediante su caracterización y determinación estructural permitiría identificar y establecer las principales características y similitudes entre estos dos grupos de péptidos.

Las defensinas son pequeñas proteínas de entre 30 y 50 aminoácidos ricas en puentes disulfuro.<sup>(9; 10)</sup> La secuencia de aminoácidos de la DEF4 se muestra en la figura 2.1

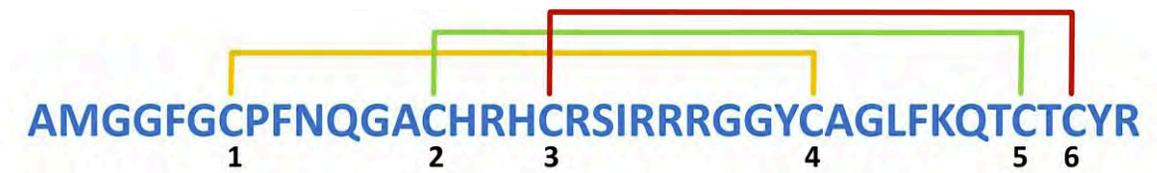


Figura 2.1. Secuencia de aminoácidos de la DEF4. La DEF4 cuenta con 6 cisteínas; que se espera formen 3 puentes disulfuro. Estos puentes son necesarios para la formación de la estructura tridimensional característica de este grupo de péptidos.

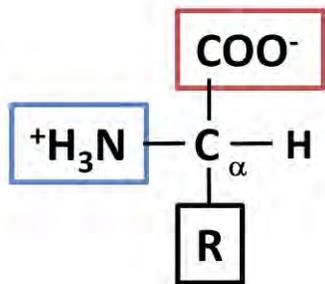
Análisis estructurales de las toxinas bloqueadoras de canales iónicos han permitido determinar la estructura de los canales de potasio<sup>(21)</sup> y conocer el mecanismo de su bloqueo por las toxinas con los canales.<sup>(8)</sup> La RMN es la mejor técnica para el estudio estructural de péptidos ricos en puentes disulfuro, pues han resultado difíciles de cristalizar. Las estructuras de péptidos menores a 50 aminoácidos se obtienen trabajando con muestras del orden de los miligramos con abundancia natural. Sin embargo, los análisis estructurales por RMN se facilitan si se emplean proteínas enriquecidas con <sup>15</sup>N, <sup>13</sup>C y/o <sup>2</sup>H.<sup>(22)</sup> La obtención de péptidos recombinantes posibilita la obtención de cantidades suficientes de material y muestras enriquecidas con estos isótopos.<sup>†</sup>

Para el diseño de estrategias eficaces en la obtención, purificación y caracterización de péptidos como la DEF4 es necesario tener en mente las características y propiedades principales de estas macromoléculas.

<sup>†</sup> Se han desarrollado<sup>(31)</sup> y, en la actualidad, se optimizan métodos de síntesis en química orgánica para péptidos y proteínas.

## 2.2 PÉPTIDOS Y PROTEÍNAS

Las proteínas son un grupo de macromoléculas fundamentales en las estructuras y funciones celulares.<sup>(23; 24)</sup> Estas son polímeros naturales y están constituidas por aminoácidos y derivan su nombre de los dos grupos funcionales presentes en estas

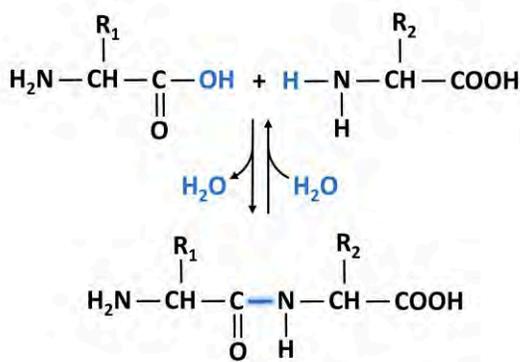


moléculas: el grupo amino (NH<sub>3</sub>) y el ácido carboxílico

Figura 2.2. Esquema general de un α-aminoácido.<sup>(23)</sup> Encerrados en rectángulos el grupo amino (NH<sub>3</sub>) y el grupo de ácido carboxílico (COOH); presentes en un aminoácido. El grupo R representa los grupos sustituyentes que distinguen a los α-aminoácidos. Los grupos están interconectados por un átomo de carbono denominado carbono alfa (Cα).

(COOH).

Los aminoácidos más frecuentes en las proteínas son los aminoácidos alfa. Estos se encuentran constituidos por grupo amino, carboxilo y un sustituyente R el cual varía para cada aminoácido. Todos se encuentran unidos por un carbono central denominado carbono alfa (figura 2.2). Cada aminoácido posee características químicas diferentes de acuerdo al grupo funcional R (Apéndice C).<sup>(23)</sup> En la naturaleza predominan 20 α aminoácidos (Apéndice C) que pueden asociarse vía enlace peptídico en un gran número combinaciones. En la naturaleza se encuentran principalmente los estereoisómeros L<sup>(23)</sup> de los aminoácidos. Los aminoácidos se condensan para formar los péptidos y/o proteínas



mediante un enlace químico covalente: *el*

Figura 2.3. El enlace peptídico. La figura muestra la condensación de dos aminoácidos por un enlace peptídico. Este enlace es el que hace posible la formación de una proteína.

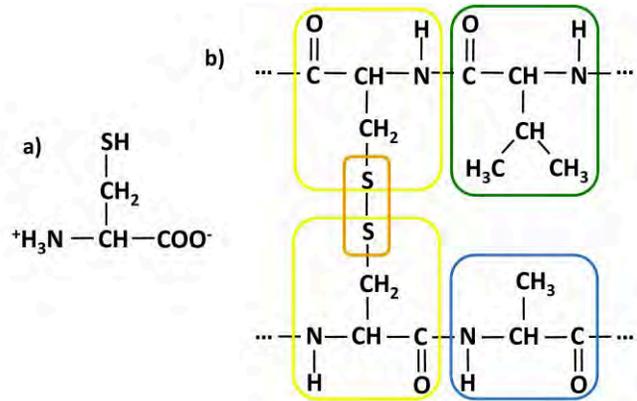
*enlace peptídico* (figura 2.3).

### 2.2.1 ARQUITECTURA PROTEICA

Para caracterizar la estructura de una proteína se toman en cuenta distintos criterios, los cuales se encuentran organizados en niveles estructurales. Dichos niveles de organización estructural van de la estructura primaria hasta la cuaternaria. Estos niveles estructurales caracterizan a cada proteína haciendo visibles las principales diferencias estructurales. Los niveles de estructuración develan la rica y basta arquitectura que existe en las proteínas.<sup>(24)</sup>

La secuencia de asociación de los aminoácidos en una proteína se le nombra *estructura primaria*. La secuencia de aminoácidos se escribe convencionalmente comenzando por el extremo amino terminal al extremo carboxilo terminal en la cadena de aminoácidos. La *estructura secundaria* se refiere al arreglo espacial del esqueleto (-N-C $\alpha$ -CO-) generado a partir de la conformación descrita por los ángulos y distancias de enlace y ángulos diedros, no es necesariamente regular, ya que se consideran giros, asas y “random coil” en esta categoría. En este nivel se consideran las fuerzas estabilizadoras de corto alcance (como los puentes de hidrógeno en las *hélices alfa*, *hojas beta* y giros). Ciertas combinaciones de aminoácidos favorecen la formación de hélices alfa así como otras la formación de hojas beta. En el siguiente nivel de estructura (*estructura terciaria*) se encuentra el plegamiento general de la cadena polipeptídica, en donde se considera el arreglo espacial resultante del conjunto de elementos de estructura secundaria, tomando en cuenta el acomodo de las cadenas laterales, el nivel de compactación y los contactos estabilizantes de largo alcance, tales como los puentes disulfuro, los cuales son, enlaces covalentes entre los grupos sulfhidrilo de dos aminoácidos de cisteína,<sup>(23)</sup> puentes salinos entre aminoácidos básicos y ácidos ionizados, puentes de hidrógeno entre grupos polares encerrados en el núcleo y de manera muy significativa: “el efecto hidrofóbico”, cuyo nombre es equivoco, pero así se ha establecido.

Figura 2.4. Puentes disulfuro. En el inciso a) se ilustra una cisteína aminoácido. En b) se muestra un puente disulfuro. El enlace covalente entre los átomos de azufre de las dos cisteínas es el responsable de un puente disulfuro. La alanina en la cadena de abajo y valina en el recuadro en la esquina superior derecha ilustran la pertenencia de las cisteínas a una cadena de aminoácidos.



En la mayoría de las proteínas, la actividad biológica depende de la estructura tridimensional. Por ello es importante verificar que la proteína bajo estudio se encuentre correctamente plegada. Aunque en principio la estructura tridimensional de la proteína está codificada en su estructura primaria,<sup>(25)</sup> la capacidad del polipéptido para adquirir su estructura nativa es afectada por condiciones fisicoquímicas en el ambiente cercano a la proteína, como la naturaleza del disolvente y de factores externos como la temperatura, fuerza iónica, pH, entre otros.

El último nivel estructural comprende la asociación de varios polipéptidos, mediante interacciones covalentes, por puentes disulfuro y/o interacciones no covalentes como los puentes de hidrógeno. A este nivel se le conoce como *estructura cuaternaria* de una proteína. Cabe hacer notar y resaltar la distinción entre proteína y polipéptido ó subunidad. La proteína es la macromolécula con una función definida, generalmente biológica, misma que puede poseer una o más cadenas de polipéptidos. A diferencia de esta última los polipéptidos o subunidades se refiere a una cadena aislada que puede ser parte, o el total, de una proteína.

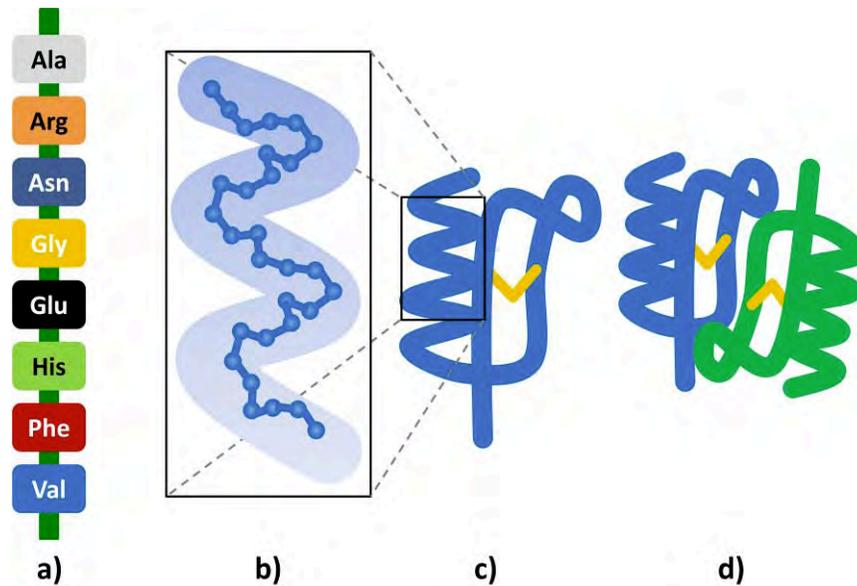


Figura 2.5. Niveles estructurales de proteínas. En a) la estructura primaria de una proteína: la secuencia de aminoácidos. En b) se observa una hélice  $\alpha$  en conjunto con las hojas  $\beta$  conforman la estructura secundaria. El inciso c) muestra la estructura terciaria de una proteína: el plegamiento. Se muestra un puente disulfuro de amarillo. El inciso d) muestra la estructura cuaternaria de una proteína: un dímero de péptidos unidos por puentes de hidrógeno.

### 2.2.2 SÍNTESIS DE PROTEÍNAS

La información necesaria para la biosíntesis de proteínas se encuentra almacenada en las moléculas de ácido desoxirribonucleico (ADN) contenidas en el genoma de la célula. El ADN es un polímero lineal constituido por un esqueleto de fosfatos y desoxirribosa. Unido a cada molécula de desoxirribosa hay una de cuatro posibles bases nitrogenadas: adenina, timina, guanina o citosina. Estas bases pueden combinarse en cualquier orden a lo largo de la cadena. Esta combinación es la que establece el orden específico en el que deben de ser introducidos los aminoácidos en cada proteína. Cada aminoácido está codificado por una o más secuencias específicas de tres bases llamados tripletes o codones. Por ejemplo, los tripletes que se traducen como fenilalanina son timina-timina-timina y timina-timina-citosina. Las proteínas no se sintetizan directamente del ADN, sino a través de una "copia" desechable en forma de ácido ribonucleico (ARN). El proceso de copiado se conoce como transcripción y es realizado por un grupo de enzimas llamado polimerasas de ARN. La traducción de ARN a proteína es realizada por los ribosomas de la célula. El

descubrimiento de estos mecanismos ha permitido la producción de proteínas con técnicas de ingeniería genética.<sup>(24)</sup>

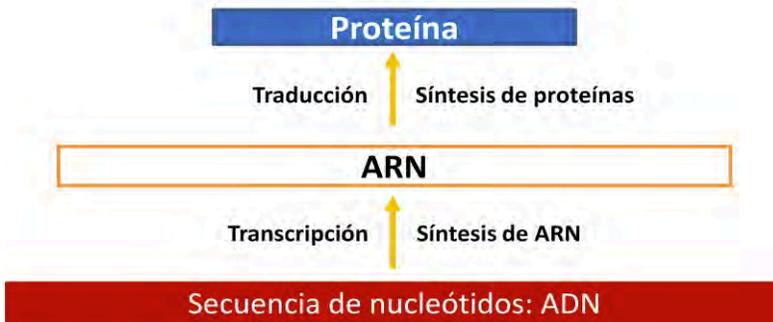


Figura 2.6 Biosíntesis de proteínas. Se esquematiza la síntesis de proteínas a partir de ADN. Este genera vía *transcripción* el ARN que mediante la *traducción* genera proteínas.

Las células han logrado desarrollar mecanismos para armonizar y acoplar el aprovechamiento de los nutrimentos en la síntesis de proteínas.<sup>(26)</sup> Aprovechando el conocimiento del mecanismo involucrado en la biosíntesis de proteínas, la química del ADN y la regulación de la expresión genética se han logrado diseñar estrategias con el fin producir proteínas de interés científico y biotecnológico.<sup>(24; 27)</sup>

### 2.3 PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Una proteína es denominada recombinante cuando proviene de la expresión de genes que son producto del proceso de recombinación genética.<sup>(24)</sup> En la biología molecular la ingeniería genética hace uso de enzimas de restricción que cortan secuencias específicas de ADN en conjunto con otras que reparan el material genético.<sup>(24)</sup> Con estas enzimas, distintos materiales genéticos son recombinados en uno nuevo para producir un nuevo ADN recombinante. La figura 2.7 muestra la recombinación de una secuencia de ADN que codifica para una proteína de interés con un plásmido que permite su expresión en una célula huésped.

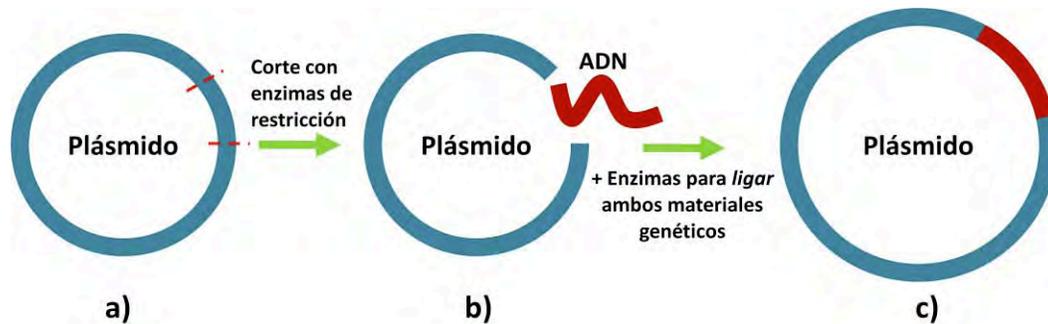


Figura 2.7. Recombinación genética. En a) se muestra la acción de las enzimas de restricción. En b) se inserta ADN con la secuencia de nucleótidos necesarios para expresar la proteína recombinante deseada; c) los extremos afines se alinean y unen mediante ligasas formando un nuevo plásmido.

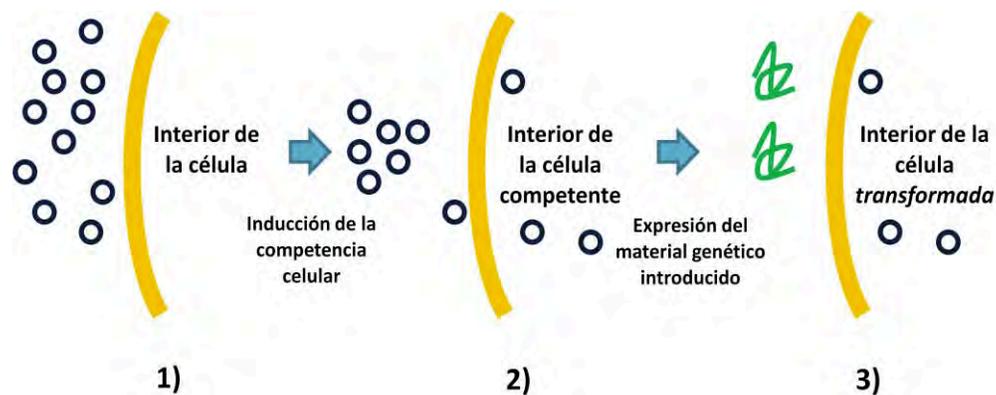
### 2.3.1 PLÁSMIDOS

Los plásmidos son moléculas circulares de ADN que tienen todos los elementos necesarios para su duplicación de manera independiente al ADN genómico del organismo huésped, su tamaño varía desde 1 kb a aproximadamente 200 kb.<sup>(24)</sup> Aunque los plásmidos pueden ser considerados como parásitos, generalmente son tolerados por la célula porque en ellos están codificadas proteínas que le confieren alguna ventaja, como por ejemplo, la resistencia a antibióticos o la producción de alguna toxina. Los plásmidos utilizados en la tecnología recombinante son insertados en el organismo huésped mediante diferentes técnicas, cuando los huéspedes son bacterias la más común es la transformación.<sup>(27)</sup>

### 2.3.2 TRANSFORMACIÓN GENÉTICA

La transformación es la alteración genética de una célula bacteriana que resulta de la introducción y expresión de material genético libre. Para que esto sea posible es necesario que las células sean competentes. Las cuales son aquellas que se encuentra en un estado tal que permite la incorporación de ADN libre en el ambiente exógeno a ella.<sup>(24)</sup> La obtención de células competentes es un proceso importante en la transformación y la subsecuente obtención de proteínas recombinantes. La gran mayoría de las células no son competentes de forma natural. Este estado se induce regularmente colocando células en estrés con disoluciones de  $\text{CaCl}_2$ , entre otras. El “estrés” al cual es sometida la célula permite el paso del material genético al interior de la célula. Posteriormente, con la

expresión del material genético introducido al interior de la célula se completa la transformación genética. Existen diversos protocolos para producir este tipo de células y transformaciones (Apéndice D).



**Figura 2.8. Transformación genética.** En a) plásmido y célula fuera del estado de competencia. El plásmido no puede incursionar dentro de la célula. En b) una célula competente permite el transporte del plásmido al interior de la célula; c) el proceso se completa con la expresión del material genético introducido.

Este tipo de técnicas son las empleadas para la producción de proteínas recombinantes,<sup>(28)</sup> de este modo miles de proteínas han sido y son producidas para estudios de actividad biológica, intereses biotecnológicos y determinaciones estructurales.

### 2.3.3 EL SISTEMA T7 PARA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Existen diferentes sistemas para la producción de proteínas recombinantes en *E. coli*. Uno de los más utilizados es el desarrollado por William Studier y colaboradores a finales de los ochenta,<sup>(29)</sup> conocido como T7 o pET. Este sistema utiliza a la ARN polimerasa T7 nativa del bacteriófago DE3 para la transcripción del gen de la proteína de interés. El sistema depende de la introducción en el ADN genómico de *E. coli* del gen de la ARN Polimerasa T7 bajo el control del promotor y del operador de lactosa (*lac*), a una cepa que ha sido modificada de esta manera se le añaden las siglas DE3 en su nombre. A continuación, la cepa DE3 es transformada con un plásmido que contiene el gen de la proteína que se desea producir. En este plásmido, la transcripción de la proteína de interés está controlada por el promotor T7. Cuando se añade al medio lactosa, o alguna molécula análoga como el isopropil- $\beta$ -tiogalactopiranósido (IPTG), se activa la transcripción de la

ARN polimerasa T7 (figura 2.9) que a su vez empieza la transcripción del gen de interés (figura 2.10). El IPTG contiene un átomo azufre que impide que sea metabolizado por *E. coli*, uniéndose de forma permanente al represor. Con IPTG la expresión genética se induce por largos intervalos de tiempo provocando la expresión continua de proteínas.<sup>(30)</sup>

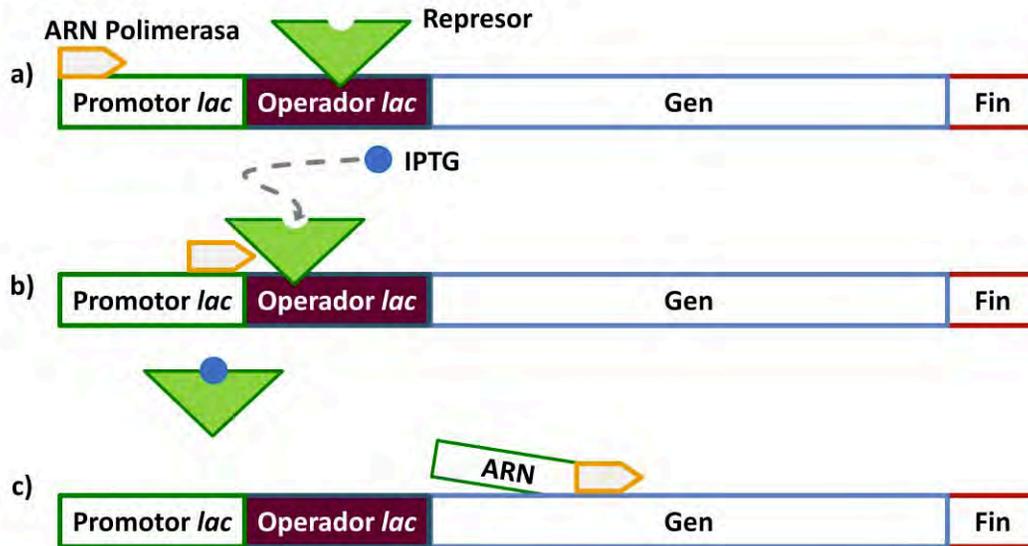


Figura 2.9. Modelo general de regulación de transcripción mediante el uso del operador *lac* e IPTG. El inciso a) muestra la acción de la proteína represora. En ausencia de lactosa, o moléculas análogas como el IPTG, el represor se encuentra fuertemente unido al operador *lac* evitando la transcripción del gen por la ARN polimerasa. b) El IPTG se une al represor ocasionando un cambio de conformación. c) Una vez unido al IPTG el represor pierde su afinidad por el ADN y se desprende, permitiendo a la ARN polimerasa iniciar la transcripción del gen.

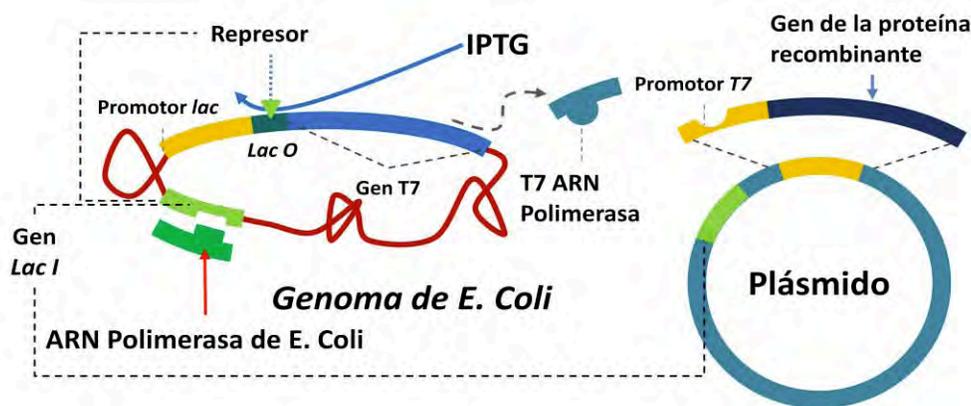


Figura 2.10. Mecanismo de expresión de una proteína recombinante mediante el sistema T7. El gen *lac I* codifica al represor *lac*, el cual es una proteína que se une al operador de lactosa (*lac o*) impidiendo la transcripción del gen de la ARN polimerasa T7. El IPTG se une al represor *lac* induciendo un cambio de estructura que lo hace desprenderse del *lac o*, una vez libre del represor la transcripción de la ARN polimerasa T7 puede llevarse a cabo. A su vez la ARN polimerasa T7 encuentra a su respectivo promotor en el plásmido y comienza la transcripción de la proteína recombinante de interés.

#### 2.3.4 ENRIQUECIMIENTO ISOTÓPICO

La determinación estructural de proteínas por RMN puede hacerse con proteínas aisladas de la naturaleza (aislándola del organismo que la sintetiza naturalmente, por ejemplo, del veneno de un alacrán), de forma biosintética (utilizando y manipulando células genéticamente) ó mediante síntesis química.<sup>(31)</sup> Sin embargo, para realizar el estudio estructural de la proteína de interés, es importante contar con muestras lo suficientemente concentradas (alrededor de 1 M) y/o enriquecida con isótopos activos en RMN para facilitar los estudios estructurales de RMN.<sup>(22)</sup> Los isótopos activos en RMN de  $^{13}\text{C}$  y  $^{15}\text{N}$  son muy escasos en las proteínas, debido a la abundancia relativa de esos isótopos. Los estudios de RMN podrían requerir que las proteínas estén enriquecidas con  $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$  y/o  $^2\text{H}$ . Por tal motivo, las expresiones de proteínas recombinantes descritas con anterioridad son realizadas en medios de cultivo de composición controlada, conocidos como medios mínimos. Un medio mínimo contiene los requerimientos mínimos nutricionales para el crecimiento y desarrollo celular. El control de nutrimentos en estos medios de cultivo obliga a la célula a utilizar las únicas fuentes disponibles, de tal forma que incorporará en las proteínas cualquier tipo de isótopos seleccionado en el medio mínimo. Respectivamente se emplean sales de  $^{15}\text{N}$ , glucosa  $^{13}\text{C}_6$  o  $\text{D}_2\text{O}$ .

La experiencia de varios investigadores expresando proteínas recombinantes ha contribuido a diseñar estrategias y medios de cultivo eficaces para el marcaje isotópico. Studier ha realizado estudios sistemáticos de la expresión de proteínas recombinantes,<sup>(32)</sup> llegando a establecer la composición óptima en fuentes de carbono y nitrógeno para la producción de proteínas recombinantes en medios mínimos. Otros investigadores han desarrollado estrategias para aumentar la producción de muestras enriquecidas,<sup>(33)</sup> debido a que el enriquecimiento isotópico presenta generalmente bajos niveles de rendimiento, comparativamente con la producción en otros medios de cultivo y los altos costos de los reactivos enriquecidos.

La sobre expresión de una proteína recombinante causa diversas afectaciones a la célula en donde se sintetiza; algunas de las proteínas pueden resultar tóxicas para la célula

productora. Otro fenómeno comúnmente observado en la expresión es la formación de cuerpos de inclusión.

### 2.3.5 CUERPOS DE INCLUSIÓN Y PLEGAMIENTO *IN VITRO*

Los cuerpos de inclusión son agregados insolubles de proteínas dentro de la célula<sup>(34)</sup> y se forman cuando las proteínas expresadas no son propiamente plegadas.<sup>(35; 36)</sup> Esto sucede ocasionalmente cuando hay un exceso de expresión. Sin embargo, este no es la única causante de la formación de los cuerpos de inclusión, existen explicaciones ampliamente documentadas en la literatura a cerca del mecanismo (que aquí no se discute) de formación de los cuerpos de inclusión.<sup>(35; 35)</sup>

Las proteínas en cuerpos de inclusión pueden ser rescatadas y plegadas *in vitro*. La extracción de la proteína producida se realiza utilizando agentes que rompen las interacciones entre proteínas.<sup>(37)</sup> Los agentes más utilizados son la urea y el hidrocloreuro de guanidina a concentraciones 8 M y 6 M, respectivamente. Adicionalmente, estos agentes, denominados caotrópicos, desnaturalizan a las proteínas. Una vez solubilizadas, las proteínas son capaces de adquirir su estructura tridimensional nativa de manera autónoma una vez removido el agente caotrópico, generalmente es necesario agregar aditivos que inhiban la agregación de las cadenas en proceso de plegamiento.

En el caso de las proteínas que contienen puentes disulfuro es necesario inicialmente reducir todas las cisteínas presentes. Esto se logra con agentes reductores como el ditioneitol (DTT) y la tris(2-carboxi-etil) fosfina (TCEP). Una vez reducidas se adiciona un par redox que promueva el arreglo de los puentes disulfuro. El par agregado generalmente consiste en tioles de bajo peso molecular en concentraciones que imponen un ambiente reductor, el par más utilizado es el tripéptido glutatión en su forma reducida y oxidada, otro par más económico es el del aminoácido cisteína y su dímero cistina<sup>(38)</sup> ( $E_{pH\ 7} = -0.340$  V). Al agregar el par redox la cantidad de cisteínas reducidas son la gran mayoría, por tanto el equilibrio químico se encuentra desplazado. El par redox al intentar establecer el equilibrio químico, balanceará el número de cisteínas oxidadas en forma de puentes

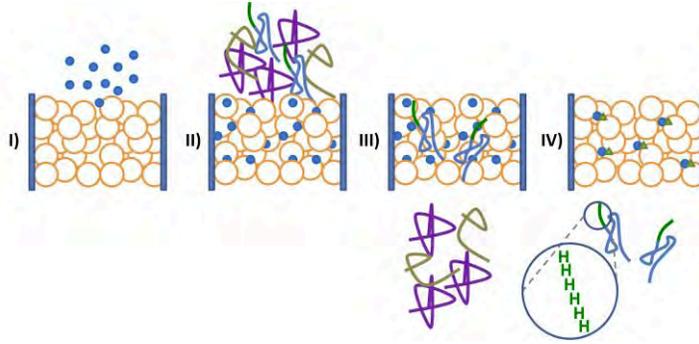
disulfuro. Esto garantiza la formación de los puentes disulfuro más estables, dándole mayores posibilidad a la proteína de alcanzar el plegamiento natural.

## **2.4 PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS**

Hoy en día, existen técnicas eficientes para la purificación de mezclas de proteínas, incluso de mezclas complejas como las provenientes de extractos celulares. Las técnicas más empleadas son cromatográficas, las cuales permiten la purificación de péptidos y proteínas específicos, aprovechando las características físicas y químicas que poseen. Un ejemplo es la cromatografía de afinidad metal quelato. Otra es la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) con un gran poder de resolución.

### **2.4.1 CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD METAL QUELATO**

Una de las grandes ventajas de la tecnología recombinante es que las proteínas pueden ser diseñadas con secuencias de aminoácidos específicas que facilitan su purificación e identificación, estas secuencias son conocidas como etiquetas. Una de las etiquetas más utilizadas es una secuencia de 6 histidinas que permite la purificación de proteínas mediante cromatografía de afinidad metal quelato. Esta cromatografía aprovecha la coordinación entre los grupos imidazólicos, presentes en las histidinas y los cationes metálicos tales como  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Ni}^{2+}$ . Los iones metálicos son fijados a los grupos funcionales de la fase estacionaria de la columna (figura 2.11). Al pasar la mezcla de proteínas por la columna activa la mezcla se fracciona gracias al efecto de coordinación descrito. Para eliminar proteínas retenidas que tienen afinidad media a la columna se lava con disoluciones con un agente que module la afinidad de estas a la fase estacionaria, como el imidazol. El incremento de la concentración de imidazol comienza a desplazar los grupos coordinados al metal fijado a la fase estacionaria.



**Figura 2.11. Purificación por cromatografía de afinidad metal quelato. Se ilustra el mecanismo. En I) se activa la columna cargando iones  $Ni^{2+}$ . Con la columna activada en II) se pasa la mezcla de proteínas. III) La mezcla se fracciona después de un lavado de la columna. IV) el desplazamiento de la proteína por la adición de un agente de mayor afinidad por los iones  $Ni^{2+}$ . En el círculo las características de las proteínas preferentemente retenidas; las cuales cuentan con una secuencia de 6 histidinas.**

La proteína recombinante es liberada con paso de una disolución concentrada en imidazol, el cual desplaza a las histidinas coordinadas al metal. La afinidad de las histidinas al metal fijado también puede ser modulada por el pH.

Los cambios en el pH pueden alterar el grado de

ionización de grupos cargados en el ligando o en la proteína. El cambio altera directamente el sitio de unión, reduciendo la afinidad, o causando alteraciones en la conformación de las moléculas. Una disminución del pH es lo más comúnmente utilizado para la elución de sustancias retenidas ( $pK_a$  anillo de imidazol en histidinas = 6.04). Una disminución del pH trae consigo el aumento de la concentración de iones  $H^+$ , los cuales pueden interaccionar con el par electrónico libre del anillo de imidazol en las histidinas, responsable de la coordinación al metal fijo en la columna. Esto a la postre tendría un efecto negativo en la coordinación del metal con el anillo mencionado. Esta cromatografía es utilizada como primer paso de purificación, difícilmente, se logra la purificación a homogeneidad de una proteína.

#### 2.4.2 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA (HPLC) DE PÉPTIDOS Y PROTEÍNAS

La purificación con esta técnica consigue la mayor pureza de una muestra de proteína. Generalmente las proteínas en esta técnica se purifican con columnas de fase reversa C18. En estas columnas la retención es proporcional al carácter polar y en menor proporción al tamaño de las partículas que atraviesan por la columna, siendo las partículas menos polares las más afines a la columna. Si la elución comienza con  $H_2O$ , un disolvente polar, las sustancias que abandonaran primero la columna serán las más polares, es decir, las que

casi no interactúan con la columna. Para la elución total de todas las sustancias introducidas a la columna se utilizan una fase móvil menos polar, por ejemplo, acetonitrilo. Estos disolventes son los más utilizados en la separación por HPLC en fase reversa. Regularmente, a estos solventes se les agrega ácido trifluoroacético (TFA). La adición tienen como objetivos ajustar el pH de la disolución a alrededor de 1.5 - 2, neutralizar los grupos silano libres en la columna y crear o neutralizar cargas en la proteína para una mejor interacción con la fase estacionaria.<sup>(39)</sup> Utilizando HPLC para purificar la proteína, se obtienen los mejores resultados en cuanto a la pureza del péptido destinado al análisis por RMN.

## **2.5 RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR**

El fenómeno de resonancia magnética nuclear (RMN) fue medido por primera ocasión en 1946 independientemente por Félix Bloch y Edwards Mills Purcell.<sup>(40; 41)</sup> A partir de este suceso, la resonancia magnética nuclear (RMN) se ha desarrollado y convertido en una herramienta extraordinaria para el estudio de la materia a nivel atómico.

En Química la RMN es utilizada extensamente para determinar estructuras moleculares. La aplicación de la RMN en distintos campos de la investigación ha permitido abordar el estudio de sistemas de gran complejidad estructural como anillos bicíclicos, de polímeros en síntesis orgánica, además de macromoléculas como los polisacáridos, proteínas,<sup>(42)</sup> ADN, entre otros. La RMN ha abordado estos desafíos superando limitaciones tecnológicas e impulsando el estudio formal del fenómeno; permitiéndole prosperar como una de las técnicas más poderosa para el estudio de la estructura de la materia.

### **2.5.1 LA UTILIDAD DE LA PROPIEDADES NUCLEARES**

La resonancia magnética nuclear aprovecha algunas propiedades intrínsecas del núcleo atómico como el magnetismo y el momento de espín. El espín nuclear se representa con el número cuántico  $I$  y puede tomar valores enteros (0, 1, 2, ...) o semienteros ( $1/2, 3/2, 5/2, \dots$ ). Los núcleos de mayor importancia en RMN son los núcleos con  $I = 1/2$ . En la tabla 2.1 se enlistan algunos de los núcleos más frecuentes en moléculas orgánicas y biomoléculas.

El espín del núcleo puede asociarse al momento angular  $\mathbf{P}$  mediante la ecuación 2.1. Este momento es asociado a su vez al momento magnético  $\boldsymbol{\mu}$  (ecuación 2.2), donde la magnitud del momento magnético del núcleo depende proporcionalmente de la constante giromagnética  $\gamma$ :

$$\mathbf{P} = \sqrt{I(I + 1)}\hbar \quad (2.1)$$

$$\boldsymbol{\mu} = \gamma\mathbf{P} \quad (2.2)$$

Al colocar un núcleo con momento angular  $\mathbf{P}$  en un campo magnético  $\mathbf{B}_0$  orientado a lo largo del eje z, el momento angular se direcciona en el sentido del campo magnético aplicado, descrito por la ecuación 2.3.

$$P_z = m\hbar \quad (2.3)$$

En la ecuación 2.3  $m$  es el número cuántico magnético y representa a los valores propios de la función de onda  $\Psi$  al aplicarle el operador de espín  $\hat{I}_z$ ,  $m$  solo puede tomar valores de que van desde  $I, I-1, I-2, \dots$ , hasta  $-I$ . Sustituyendo  $P_z$  en la ecuación del momento magnético  $\boldsymbol{\mu}$  (ecuación 2.2) tenemos:

$$\mu_z = m\gamma\hbar \quad (2.4)$$

Un núcleo con espín  $I$  posee  $2I + 1$  estados energéticos posibles de acorde con cada uno de los valores del número cuántico  $m$ . Al aplicar un campo magnético  $\mathbf{B}_0$ , los subniveles del espín nuclear se desdoblan. Para los núcleos con  $I = \frac{1}{2}$ ,  $m$  toma los valores  $+\frac{1}{2}$  y  $-\frac{1}{2}$ . La energía del nivel  $m$  del espín nuclear se describe en la ecuación 2.5. El valor de la diferencia energía entre los  $m$  subniveles del espín nuclear se describe con la ecuación 2.6.<sup>(43)</sup>

$$E = -m\gamma \frac{h}{2\pi} B_0 \quad (2.5)$$

$$\Delta E = \gamma \frac{h}{2\pi} B_0 \quad (2.6)$$

$$\Delta E = h\nu \quad (2.7)$$

Las ecuaciones anteriores se utilizan para determinar la energía de los  $m$  estados del espín nuclear al aplicarle un campo magnético  $\mathbf{B}_0$ . Para correlacionar o asociar el cambio de energía,  $\Delta E$ , con una frecuencia característica se utiliza la ecuación 2.7. Igualando las

ecuaciones 2.6 y 2.7 y posteriormente resolviendo la ecuación para la frecuencia  $\nu$ , se obtiene la ecuación 2.8.

$$\nu = \frac{\gamma}{2\pi} B_0 \quad (2.8)$$

Esta ecuación establece que cada  $\Delta E$  está asociado a una frecuencia característica para promover el cambio entre los distintos estados de espín nuclear. Para promover el cambio de un espín nuclear del estado  $\alpha$  (de menor energía) al estado  $\beta$  (Figura 2.12), se irradia a los núcleos con una onda electromagnética que cumpla con la frecuencia característica descrita en la ecuación 2.8.

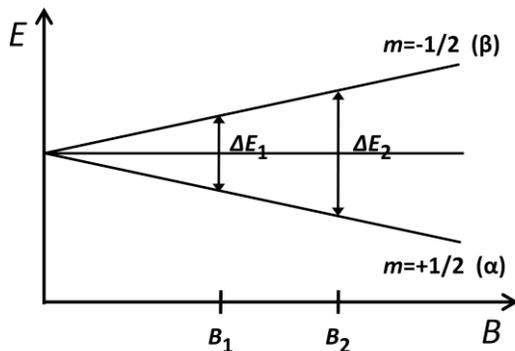


Figura 2.12. El efecto Zeeman de un núcleo con espín  $I=1/2$ . Se ilustra el desdoblamiento de los niveles energéticos del espín nuclear en función de la intensidad del campo magnético B.

En la figura 2.12 se muestra el efecto Zeeman de un núcleo cuando se le impone un campo magnético  $B_0$ . Los niveles energéticos de los posibles estados del espín nuclear se desdoblan proporcionalmente al campo aplicado, en consecuencia, las transiciones entre los niveles energéticos del espín nuclear serán de mayor energía entre mayor sea el campo magnético aplicado.<sup>(44)</sup>

Tabla 2.1. Propiedades nucleares de isótopos selectos.<sup>(42)</sup>

Isótopo ( $I = 1/2$ )	$\gamma \times 10^{-7}$ (rad $T^{-1} s^{-1}$ )	$\nu$ a 11.74 T (MHz)	Abundancia natural (%)	Sensibilidad	
				Relativa <sup>a</sup>	Absoluta <sup>b</sup>
<sup>1</sup> H	26.75	500	99.98	1	1
<sup>13</sup> C	6.73	125.7	1.11	$1.6 \times 10^{-2}$	$1.8 \times 10^{-4}$
<sup>15</sup> N	-2.71	50.7	0.37	$1.0 \times 10^{-3}$	$3.8 \times 10^{-6}$
<sup>31</sup> P	10.83	202.4	100	$6.6 \times 10^{-2}$	$6.6 \times 10^{-2}$

<sup>a</sup> Sensibilidad relativa a campo constante para el mismo número de núcleos.

<sup>b</sup> Producto de la sensibilidad relativa y la abundancia natural.

### 2.5.2 DESPLAZAMIENTO QUÍMICO

La diferencia de energía para cada núcleo definido en la ecuación 2.6, no considera las modificaciones producidas por la diferencia en las densidades electrónicas locales en una molécula. A este fenómeno se le conoce como constante de apantallamiento la cual modifica la diferencia de energía para cada núcleo. Por tanto, la ecuación 2.6 se puede escribir en la ecuación 2.9.

$$\Delta E = \gamma \hbar (1 - \sigma) B_0 \quad (2.9)$$

A esta propiedad que permite diferenciar a núcleos no equivalentes se le conoce como desplazamiento químico. El desplazamiento químico se mide en unidades adimensionales llamadas ppm (ecuación 2.10).

$$\text{ppm} = \left( \frac{\nu_{\text{obs}} - \nu_{\text{ref}}}{\nu_{\text{ref}}} \right) 10^6 \quad (2.10)$$

El desplazamiento químico es un parámetro que depende directamente de la estructura de la molécula, de modo que, modificaciones en la estructura producen alteraciones en los desplazamientos químicos, debido a que la densidad electrónica cercana al núcleo observado se modifica y por consecuencia la constante de apantallamiento se modifica. Por ejemplo, el desplazamiento químico de los protones alfa (**H $\alpha$** ) de aminoácidos, por encontrarse flanqueados por grupos NH y CO, se encuentra entre 3.8 – 4.9 ppm mientras que los CH<sub>2</sub> de ácidos aspárticos o asparaginas se encuentran entre 2.4 – 2.8 ppm.<sup>(42)</sup> Esta propiedad permite estudios de complejación en proteínas.

### 2.5.3 RMN DE PROTEÍNAS

La función biológica de una proteína está fuertemente correlacionada con su estructura tridimensional, por tal motivo el estudio estructural toma un gran significado. La RMN se ha empleado para estudiar la estructura de proteínas. También puede emplearse para estudiar la dinámica de proteínas, así como para hacer estudios de complejación mediante las modificaciones de los tiempos de relajación y del desplazamiento químico.

En RMN se cuenta con secuencias de pulsos sofisticadas para el estudio estructural de proteínas.<sup>(45)</sup> Un ejemplo es la secuencia de pulsos TOCSY que permite observar los

sistemas de espín característicos para cada aminoácido presente en una proteína (Apéndice H). La identificación de los sistemas de espín de cada aminoácido en la proteína, permite discernir las señales producidas en el espectro y subsecuentemente establecer interacciones a través del espacio mediante el espectro NOESY.<sup>(45)</sup> Estas interacciones son traducidas en restricciones espaciales. Este proceso en conjunto con otros experimento,<sup>(22)</sup> permiten elucidar la estructura tridimensional de una proteína utilizando RMN (los estudios estructurales para la DEF4 están fuera de los alcances de este trabajo).

Dentro de la gama de experimentos con los que se cuentan en RMN se encuentra el experimento en dos dimensiones HSQC. Este experimento establece las correlaciones entre protones y heteroátomos a un enlace de distancia. El  $^{15}\text{N}$ -HSQC establece las conectividades de todos los pares de  $^{15}\text{N}$  y  $\text{H}_\text{N}$  en una proteína enriquecida con este isótopo de nitrógeno. Específicamente en las proteínas, las regiones que presentan estas correlaciones son las del esqueleto y las cadenas laterales de argininas, lisinas, asparaginas, histidinas, glutaminas y triptófanos. Las prolinas no muestran estas correlaciones, porque aunque cuentan con un heteroátomo de nitrógeno este no está unido directamente a un átomo de hidrógeno.

Una gran ventaja del experimento  $^{15}\text{N}$ -HSQC en el análisis de proteínas, es la dispersión de las señales en dos dimensiones. Cuando las proteínas se encuentran plegadas, los desplazamientos químicos de nitrógeno y protón modifican su valor en comparación con proteínas totalmente desnaturalizadas.<sup>(46)</sup> Cuando las proteínas se encuentran plegadas, la dispersión de las señales indica que la proteína tiene un arreglo tridimensional y que difiere de una macromolécula que carece de una conformación específica. En ocasiones es posible observar grupos metilos que se encuentran a desplazamientos químicos negativos, cuando normalmente aparecen entre 1.3 y 0.8 ppm. Así mismo, los desplazamientos químicos de los  $\text{H}_\text{N}$  se encuentran normalmente entre 9 y 6.5 ppm, pero cuando la proteína se encuentra plegada los desplazamientos químicos pueden variar de 10.5 a 5.5 ppm. Esto obedece a que una proteína plegada contiene múltiples interacciones de estos protones con grupos adyacentes formando puentes de hidrógeno. Como se ha mencionado, el desplazamiento químico depende enteramente del entorno químico del

átomo detectado por RMN. Por tanto este parámetro es sumamente sensible a las modificaciones del entorno electrónico. Claramente el desplazamiento químico de los  $H_N$  es distinto en proteínas plegadas, debido a que estas establecen múltiples interacciones intramoleculares, en contraste con las proteínas desnaturalizadas que no establecen la misma cantidad de interacciones. Así, puede monitorearse y posteriormente caracterizarse por RMN el plegamiento adoptado por una proteína.

## **2.6 MODELADO MOLECULAR POR HOMOLOGÍAS**

La cristalografía de rayos X y la RMN se han consolidado como las técnicas que permiten la determinación de la estructura tridimensional de una proteína. Estas han ampliado y enriquecido el conocimiento estructural de las proteínas y son en la actualidad la mejor herramienta que posee la ciencia para el estudio estructural de estas macromoléculas. Sin embargo, existen otras herramientas para indagar las características estructurales de una proteína que no cuenta con la estructura determinada por las técnicas antes descritas. Una de ellas es el modelado de estructura de proteínas por homologías.

El modelado por homologías es una alternativa para explorar la estructura tridimensional de una proteína. Esta metodología fundamenta su funcionamiento en la comparación y búsqueda de identidades o similitudes, entre las secuencias de aminoácidos de la proteína bajo análisis y estructuras determinadas por rayos X y RMN. Cuando se encuentran secuencias similares a nivel de estructura primaria, puede suponerse que la proteína analizada tendrá un plegamiento similar a la proteína reportada. De las estructuras homólogas y determinadas experimentalmente se obtienen las restricciones espaciales, que son fundamentales para construir el modelo estructural de la proteína bajo estudio.

Las ventajas y desventajas del método radican principalmente en la obtención de buenas plantillas o estructuras homólogas. Si se hallan secuencias reportadas con un alto porcentaje de homologías o similitudes a la proteína de interés, es más probable que el

modelo emule a la estructura real. De lo contrario, la técnica tiende a ser muy limitada en la obtención de un modelo de estructuras proteicas.

Para hacer modelaje por homología es necesario contar con una proteína de estructura 3D conocida que comparta por lo menos 30% de su estructura primaria con la proteína cuya estructura se desea modelar.

### 3 DISEÑO EXPERIMENTAL

El diseño experimental consiste en la construcción del plásmido para la expresión de DEF4 en el citoplasma de *E. coli*. Posteriormente, se requiere encontrar las condiciones para optimizar la expresión del péptido. Finalmente el péptido requiere ser purificado, plegado y posteriormente caracterizado.

#### 3.1 CONSTRUCCIÓN DEL PLÁSMIDO PARA LA OBTENCIÓN DE LA DEF4

El primer paso para la biosíntesis de proteínas recombinantes es obtener el gen que codifique la proteína de interés. El método tradicional es copiarlo directamente del genoma del organismo en cuestión, o de una biblioteca de cADN, utilizando la reacción en cadena de la ADN polimerasa (PCR), pero los métodos de síntesis artificial de genes poco a poco están sustituyendo a la clonación clásica. En el caso de la DEF4 se optó por sintetizar el gen por el método de ensamble de oligonucleótidos basado en PCR,<sup>(47)</sup> para lo cual se mandaron sintetizar cuatro oligonucleótidos que se muestran en la tabla 3.1.

**Tabla 3.1. Secuencia de ADN y oligonucleótidos diseñados para su síntesis por el método de ensamblaje por PCR**

<b>Secuencia de DEF4</b>	
1	GATGATCCATGGGCGGTTTTTCGGTTGCCCGTTCAACCAGGGTGCGTGCCACCGTCACTGCC
61	GTTCTATCCGTCGTCGTTGGTGGTTACTGCGCGGGTCTGTTCAAACAGACCTGCACCTGCT
121	ACCGTTAGGGATCCGAT
<b>Oligonucleótidos</b>	
1	GATGATCCATGGGCGGT
2	GGCAGTGACGGTGGCACGCACCCCTGGTTGAACGGGCAACCGAAACCGCCCATGGATCATC
3	GCCACCGTCACTGCCGTTCTATCCGTCGTCGTTGGTGGTTACTGCGCGGGTCTGTTCAAAC
4	ATCGGATCCCTAACGGTAGCAGGTGCAGGTCTGTTGAACAGACCCGCG
<b>Ensamblaje</b>	
1	3
1	GCCACCGTCACTGCC
CTACTAGGTACCCGCCAAAGCCAACGGGCAAGTTGGTCCCACGCACGGTGGCAGTGACGG	<--- 2
61	GCGCCCAGACAAGTTTGTCTGGACGTGGACGA
121	
TGGCAATCCCTAGGCTA	<--- 4

Mediante PCR los oligonucleótidos son ensamblados de acuerdo al ensamblaje descrito en la tabla 3.1. Los sitios vacantes en el gen son rellenos por la ADN polimerasa, la cual reconoce el nucleótido específico y coloca la base correspondiente en la cadena complementaria del gen sintetizado. En este experimento se utilizó la ADN polimerasa de *Pyrococcus furiosus* (Pfu, Stratagene). Las sustancias, cantidades y ciclos de la reacción de PCR para el sintetizar el gen mostrado al inicio de la de esta sección se muestran en la tabla 3.2.

**Tabla 3.2. Condiciones experimentales y ciclos de temperatura para sintetizar el gen de DEF4 por PCR.**

Sustancia	Concentración ó cantidad	Temperaturas
dNTPs	0.2 mM c/u	I. a) 95°C durante 02 min
Oligonucleótidos	0.2 mM c/u	II. a) 95°C durante 30 seg
Tris (pH 8.8)	20 mM	b) 60°C durante 30 seg
MgSO <sub>4</sub>	2 mM	c) 72°C durante 90 seg
KCl	10 mM	II. a) 72°C durante 05 min
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10 mM	<b>Secuencia del ciclo</b>
Tritón X-100	0.1% v/v	I → II x 25 → III
BSA*	5 µg	El paso II se repite en 25 ocasiones antes del paso III.
Pfu	5 unidades	
<i>Volumen final de 50 µL</i>		
<i>*BSA = Albúmina sérica bovina</i>		

Una vez obtenido el gen, es necesario insertarlo en un plásmido. El plásmido seleccionado para la expresión de DEF4 es un derivado del plásmido comercial pET28a (Novagen), este derivado fue generado en el Laboratorio Europeo de Biología Molecular (EMBL) en Heidelberg, Alemania por Gunter Stier y se le ha nombrado pEMBL-HIS. Cuando el plásmido se recombina con el gen de interés, mediante el uso de enzimas de restricción, genera una construcción que consiste en el gen fusionado a una serie de secuencias auxiliares que facilitan la subsecuente purificación de la proteína. Una vez aprovechadas las propiedades de las secuencias auxiliares deben retirarse por lo que la proteína de fusión incluye un sitio de reconocimiento para una proteasa específica que corta a la proteína de fusión liberando a la proteína objetivo de las secuencias auxiliares.

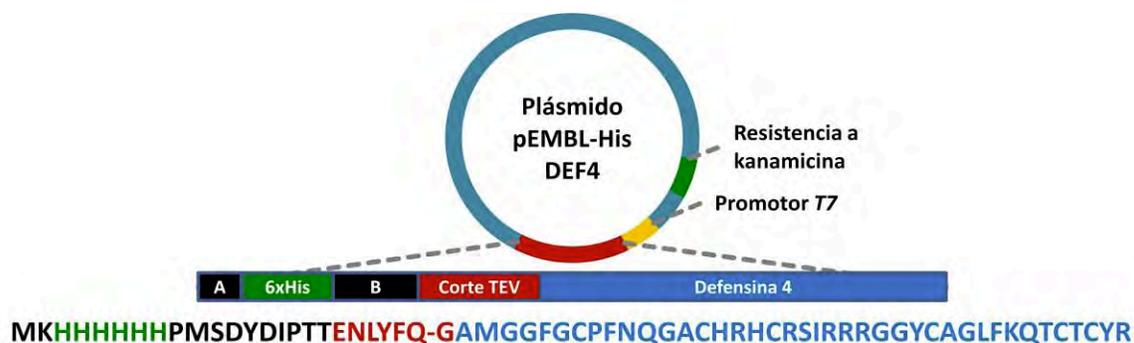


Figura 3.1. Esquema de la construcción utilizada para la obtención de la DEF4. La proteína recombinante (7.5 kDa) cuenta una etiqueta de 6 histidinas útil para la purificación. Las letras de color rojo muestran el sitio de reconocimiento de la proteasa TEV; esta hidroliza el enlace representado por el guión en la secuencia liberando a la DEF4.

La secuencia de aminoácidos de la construcción para la expresión de DEF4 se muestra en la figura 3.1. La proteína de fusión diseñada contiene tres regiones importantes: 6 histidinas consecutivas que facilitan la purificación, sitio de corte reconocido por la proteasa TEV y la secuencia de aminoácidos de la DEF4.

### 3.2 EXPRESIÓN EN *E. COLI* DE LA DEF4

Existe una amplia variedad de cepas aptas para la expresión de proteínas mediante el sistema T7, por lo que es recomendable evaluar la expresión de cada nueva proteína recombinante en varias de ellas, pues generalmente se observan diferencias en los niveles de expresión que no es posible establecer a priori. En el caso de DEF4 el mayor nivel de expresión se encontró en la cepa Rosetta™ de Novagen. Esta cepa fue desarrollada para la expresión de proteínas cuyo ADN contiene tripletes que no son comúnmente utilizados en *E. coli*, tales como el triplete adenina-timina-adenina, que codifica a la isoleucina.<sup>(48)</sup> La construcción de DEF4 no posee ninguno de estos tripletes por lo que, posiblemente, el mayor nivel de expresión debe de ser ocasionado por alguna(s) otra(s) característica(s) de esta cepa que no han sido descrita(s).

Las células competentes de *Rosetta™* se transforman con el plásmido mostrado en la figura 3.1. Al transformar con el plásmido, la cepa adquiere resistencia a kanamicina. La resistencia a antibióticos permite establecer un control del crecimiento celular entre células transformadas y las que no contienen el plásmido.

La expresión de las células transformadas es inducida mediante la adición de IPTG al medio de cultivo. Esta inducción conlleva a la producción paulatina de la proteína de fusión, llegando a un máximo en un tiempo desconocido. Para localizar el tiempo donde la producción es máxima, se monitorea la expresión por electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) de las muestras, tomadas a intervalos de tiempo definidos a la temperatura de prueba. La temperatura se establece en función del medio de cultivo utilizado. En medios con riqueza nutrimental como el Luria Bertani, la expresión se induce a temperaturas inferiores a los 37°C, mientras que en medios mínimos se hace a 37°C. Esto corresponde a la velocidad en que son aprovechados los nutrientes en los distintos medios de cultivo. Generalmente, en medio mínimo hay una disminución considerable en el metabolismo de los nutrientes derivando en un alargamiento en el tiempo de inducción.<sup>(32)</sup>

### **3.2.1 EXPRESIÓN EN MEDIO LURIA BERTANI**

En el medio Luria Bertani (LB), denominado medio rico por el contenido de nutrientes (composición en el Apéndice B), se realiza la expresión de la proteína sin enriquecer isotópicamente para realizar las pruebas de plegamiento y caracterización. En este medio de cultivo la expresión se hizo a 30°C para maximizar la producción de proteína de fusión y reducir la degradación, al irse consumiendo los nutrientes del medio.

### **3.2.2 ENRIQUECIMIENTO ISOTÓPICO**

Para el enriquecimiento isotópico de la DEF4 se probaron dos técnicas. Con esto se observó las principales diferencias y se aprovechó las ventajas de cada técnica en la expresión de proteínas en medio mínimo. Las estrategias se probaron a 37°C tratando de minimizar los tiempos de inducción, que suelen ser largos en estos cultivos.

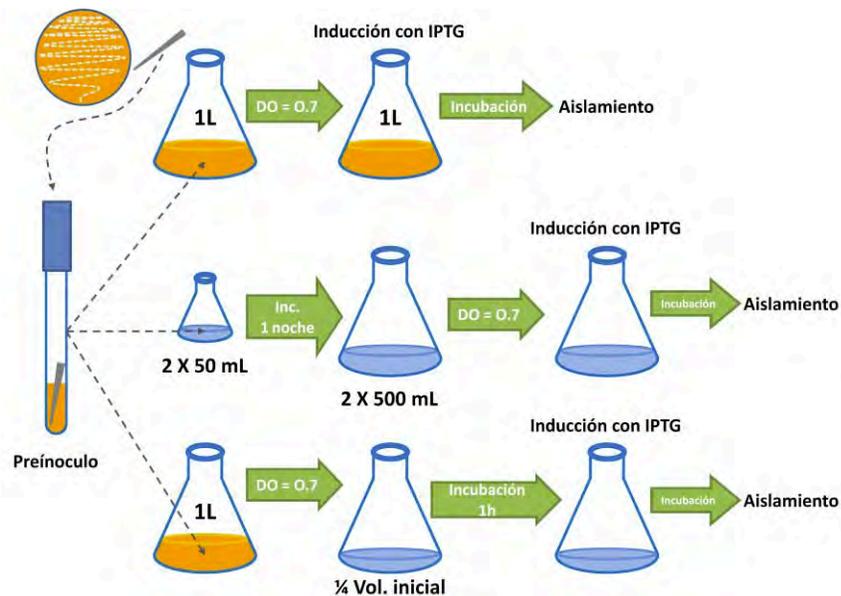
#### **3.2.2.1 REDUCCIÓN DE VOLUMEN**

Esta estrategia ha reportado el aumento considerable de la producción de proteínas recombinantes en medio mínimo.<sup>(33)</sup> La técnica consiste en crecer las células transformadas en medio LB hasta que el cultivo alcance un valor de densidad óptica a 600

nm igual a 0.7; después, el cultivo se centrifuga y el paquete celular se resuspende en la disolución amortiguadora de fosfatos del medio mínimo retirando así, sustancias citotóxicas y fuentes nutrimentales. El cultivo es de nuevo centrifugado y resuspendido en medio mínimo con las fuentes de  $^{13}\text{C}$  y  $^{15}\text{N}$ , en un cuarto del volumen original. Se incuba durante 1 hora, permitiéndoles adaptarse al medio. Finalmente, después de que se concentran y adaptan, se induce la expresión con IPTG.

### 3.2.2.2 EXPRESIÓN EN MEDIO PG

La composición de este medio de cultivo está optimizada para hacer expresiones de proteínas en medio mínimo. El protocolo (detallado en el Apéndice A) consiste en preparar un concentrado de células en este medio mínimo durante la noche previa a la inducción. Después, las células son puestas en un volumen mayor de medio mínimo y son incubadas para que alcancen una densidad óptica igual a 0.7 a 600 nm. Se inducen con IPTG una vez alcanzada la densidad óptica señalada. Expresada la proteína de fusión y determinados tiempo y temperatura de máxima expresión; el siguiente paso es aislar y purificar la proteína para realizar la caracterización y análisis.



**Figura 3.2.** Métodos y medios de cultivo empleados en la expresión de la DEF4. Una colonia aislada de células recientemente transformada, se toma y se deposita en un tubo en medio cultivo para producir un preinóculo. Con esto se producen células transformadas con las cuales se inocula el medio de cultivo pertinente. El primer método mostrado es la inducción en medio LB, el segundo el método PG y finalmente el método de reducción de volumen.

### **3.3 PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE**

La DEF4 producida por la cepa Rosetta™ de *E. coli* es necesario aislarla del resto de las proteínas y demás moléculas presentes en la célula. Si la proteína recombinante se expresa de manera soluble basta con romper la pared y membrana celulares para liberarla al medio extracelular, pero DEF4 se expresa de manera insoluble, secuestrada en cuerpos de inclusión,<sup>(49)</sup> por lo que es necesario solubilizar estos cuerpos de inclusión, una vez que se han lisado las células.

#### **3.3.1 SOLUBILIZACIÓN DE CUERPOS DE INCLUSIÓN**

Los cuerpos de inclusión pueden ser solubilizados con disoluciones amortiguadoras con urea 8 M<sup>(36)</sup> en conjunto con la aplicación fuerza mecánica (pipeteo, sonicación y homogeneización).<sup>(50)</sup> Después de lograr la ruptura y solubilización de cuerpos de inclusión, la proteína se puede purificar gracias a las secuencias auxiliares en la proteína de fusión. En la proteína de fusión se insertó una secuencia de 6 histidinas consecutivas, que permiten purificarla por cromatografía de afinidad metal quelato.

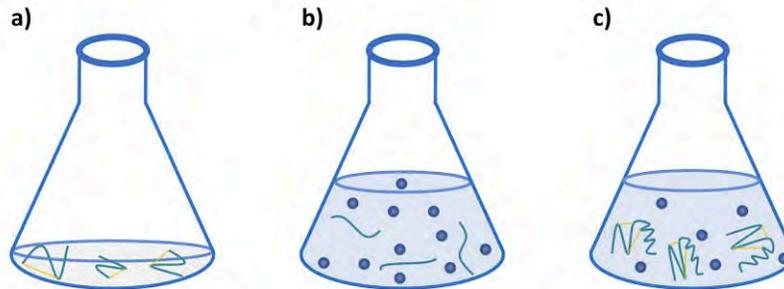
#### **3.3.2 CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD METAL QUELATO**

La proteína soluble se puede separar del resto de proteínas presentes en la disolución, aprovechando la cola de histidinas presente en la proteína recombinante. Para ello, se utiliza la cromatografía de afinidad metal quelato. La mezcla de proteínas pasa por una columna cargada con iones metálicos de Ni<sup>2+</sup> en la que la afinidad de las seis histidinas a la columna se modula modificando el pH. Para eliminar proteínas medianamente afines a la columna, se efectúan lavados con disoluciones a diferentes valores de pH. Sucesivamente, se disminuye el pH lavando con disoluciones amortiguadoras de pH 6.3 y 4.5; para provocar que las proteínas con afinidad media y alta se desprendan de los iones metálicos.

#### **3.3.3 DESNATURALIZACIÓN Y PLEGAMIENTO**

La DEF4 aislada por cromatografía de afinidad metal quelato está desnaturalizada. Antes de proceder a inducirla para que adquiera su estructura tridimensional nativa debe

tomarse en cuenta que, posiblemente, haya presentes puentes disulfuro diferentes a los nativos, por lo que es necesario eliminarlos, esto se logra con un agente reductor como el DTT.



**Figura 3.3.** Estrategia de plegamiento de la proteína de fusión. En a) las proteínas aisladas de los cuerpos de inclusión están desnaturalizadas y no presentan plegamiento. En b) Se ilustran las proteínas con las cisteínas reducidas después de la adición de DTT y la dilución de los agentes caotrópicos, para promover interacciones exclusivamente intramoleculares. La obtención del plegamiento se ilustra en el inciso c). Se deben proporcionar las condiciones que favorezcan la formación del plegamiento y los puentes disulfuro nativos, las esferas representan la acción de la arginina evitando que las proteínas tengan interacciones intermoleculares con otras proteínas y por consecuencia se agreguen.

Con la proteína desnaturalizada y reducidos los puentes disulfuro la estrategia es proporcionar las condiciones químicas que permitan el plegamiento de la proteína.<sup>(36)</sup> Esto consiste, principalmente, en reducir considerablemente la concentración del agente desnaturalizante, urea en este caso. Esto se puede lograrse mediante diálisis o mediante dilución de la proteína en una disolución amortiguadora carente de urea, en este caso se eligió hacerlo por dilución. La formación de los puentes disulfuro nativos es promovida gracias a la presencia del par redox cistina 0.5 mM y cisteína 5.0 mM. Al inicio, el equilibrio se encontrará desplazado con una mayoría casi absoluta de cisteínas (casi todas reducidas). Al restablecerse el equilibrio químico se forman los puentes disulfuro más estables, que generalmente corresponden a los puentes nativos. Durante el proceso de plegamiento es importante adicionar agentes que inhiban la agregación de las proteínas que no han sido plegadas en su totalidad, existe una gran variedad de dichos agentes, los más comunes son L-arginina, glicerol y detergentes.

### **3.3.4 CORTE DE LA PROTEÍNA DE FUSIÓN**

El corte se realiza en la proteína de fusión correctamente plegada, retirando las secuencias auxiliares que pueden obstaculizar los análisis subsecuentes. Hay diferentes proteasas que han resultado útiles para este fin tales como trombina y la proteasa factor Xa. En nuestro caso, la construcción de DEF4 contiene un sitio de reconocimiento para la proteasa del virus del mosaico del tabaco (TEV). La proteasa TEV reconoce la secuencia EXXYXQ(G/S), donde X es cualquier aminoácido e hidroliza en el enlace peptídico entre la glutamina y la glicina o serina. Es activa en gran variedad de condiciones de temperatura y pH, pero necesita un medio reductor. En general se utiliza DTT, pero en el caso de proteínas con puentes disulfuro puede ser sustituido por un par redox, como el usado en el plegamiento.

### **3.3.5 PURIFICACIÓN UTILIZANDO HPLC**

Las proteínas correctamente plegadas con la técnica descrita deben de ser separadas de aditivos, impurezas, otras proteínas y de las otras cadenas polipeptídicas que no lograron establecer la estructura tridimensional nativa. Una manera de hacer la purificación de estos péptidos en distintos plegamientos es con HPLC utilizando columnas C18 de fase reversa. La técnica utiliza gradientes de H<sub>2</sub>O y acetonitrilo con TFA al 0.5%, para separar mezclas de péptidos. Estas condiciones son desnaturalizantes pero no reductoras, de modo que se espera que una proteína con sus puentes disulfuro nativos sea menos hidrofóbica que las otras, ya que las proteínas en su conformación nativa tienden a mantener sus aminoácidos hidrofóbicos en el corazón de la molécula y, por lo tanto, no están expuestos al medio. Esta técnica es el paso final de la purificación. Antes de incorporar la muestra de proteína al equipo de RMN, es necesario retirar el acetonitrilo y TFA que se incorporaron en la purificación por HPLC, esto se logra mediante la liofilización de la muestra.

### 3.4 CARACTERIZACIÓN

#### 3.4.1 MASAS Y PLEGAMIENTO

Las muestras aisladas de las expresiones serán analizadas por espectrometría de masas, verificando de este modo la masa molecular de la proteína correcta. Con esta técnica analítica se pueden encontrar la cantidad de puentes disulfuro formados haciendo cálculos entre el valor esperado de la proteína con y sin puentes disulfuro. Otro parámetro medible a la proteína para caracterizar es la longitud de onda donde se presenta el máximo de absorción en la región de UV. El plegamiento de una proteína no siempre se puede determinar por técnica sencillas, en este caso algunos experimentos de RMN pueden proporcionar datos del plegamiento.

### 3.5 ANÁLISIS POR RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

Figura 3.4. Proceso general para la determinación estructural de proteínas por RMN. FID es el acrónimo de “Free Induction Decay”.



La finalidad de los experimentos de enriquecimiento es obtener muestra de DEF4 con isótopos activos en RMN, que permitan y faciliten el análisis por RMN.

#### 3.5.1 ANÁLISIS POR RMN

Estudios preliminares por RMN permiten conocer si la proteína se encuentra plegada. Del análisis de los espectros en una dimensión es posible discernir si la proteína se ha plegado, debido a que en proteínas plegadas las variaciones en desplazamientos químicos es mucho mayor que en una proteína que se encuentra desnaturalizada.

Para realizar el monitoreo del plegamiento se necesita obtener el espectro <sup>15</sup>N-HSQC, observar y analizar la dispersión de las señales debidas a los

protones  $H_N$ . Estos protones están inmersos en el esqueleto de la proteína y son por tanto más sensibles a las modificaciones de la estructura tridimensional de una proteína.

Si se cuenta con una proteína plegada el esquema para la determinación estructural de proteínas de la figura 3.4 puede entonces aplicarse. Para este proceso, deben obtenerse experimentos multidimensionales que permitan la asignación de las señales correspondientes a los átomos de  $^1H$ , y en ciertos casos de la asignación de las señales propias de los átomos de  $^{13}C$  y  $^{15}N$ , que conforman la cadena principal de la proteína y las cadenas laterales de los aminoácidos. Asignadas las señales de  $^1H$  de cada aminoácido, es posible realizar experimentos en los que se obtienen señales debidas a los protones que se encuentran cercanos a través del espacio, la intensidad de estas señales es proporcional a la distancia entre átomos, de modo que es posible traducir las señales producidas en una lista de restricciones de distancia que se introducen en programas de dinámica molecular para obtener un conjunto de todas las estructuras que las satisfagan.

## **4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **4.1 PRODUCCIÓN LA DEF4**

Los resultados de la expresión realizada por las técnicas con LB, reducción de volumen y el método PG se muestran a continuación. En todos los casos, la inducción de la expresión fue realizada con la adición de IPTG al medio de cultivo hasta alcanzar una concentración 1 mM. Las muestras enriquecidas de en  $^{15}\text{N}$  ( $^{15}\text{N-DEF4}$ ) y doblemente enriquecida en  $^{13}\text{C}$  y  $^{15}\text{N}$  ( $^{13}\text{C}, ^{15}\text{N-DEF4}$ ) de DEF4 fueron obtenidas por la Dra. Acely Garza con el método PG.

#### **4.1.1 MONITOREO DE LAS EXPRESIONES**

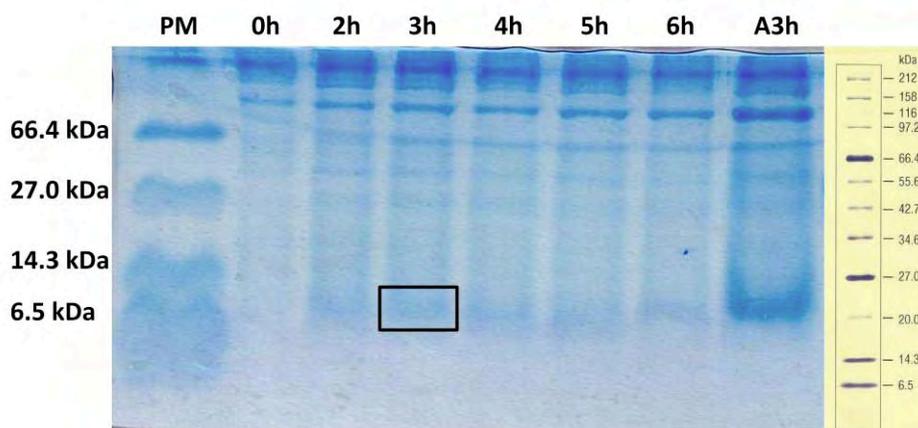
En los tres métodos empleados, la expresión fue monitoreada tomando una alícuota de 1 mL en un tubo de microfuga, centrifugándolo ( $13'000 \times g$  durante 3 minutos) y desechando el sobrenadante. La alícuota fue congelada a  $-20^{\circ}\text{C}$ , para su posterior tratamiento. El procesamiento de las muestras consistió en realizar la lisis celular y solubilización de los cuerpos de inclusión (sección 4.1.4). Finalmente, se tomó una alícuota de 30  $\mu\text{L}$  para monitorear la expresión por SDS-PAGE (Apéndice F).

#### **4.1.2 DEF4 SIN ENRIQUECER**

La expresión de la DEF4 se realizó en medio LB a una temperatura de  $30^{\circ}\text{C}$ . Con la obtención de esta proteína, se optimizarán los pasos del plegamiento. La disminución de la temperatura ( $< 37^{\circ}\text{C}$ ) en las inducciones realizadas en medios con gran riqueza nutrimental tiene como finalidad alargar el tiempo de producción de la proteína de fusión y disminuir cualquier posible degradación, de modo que se obtenga el mayor rendimiento posible en la producción de la DEF4.

La inducción con IPTG fue monitoreada por SDS-PAGE, con las muestras tomadas a los intervalos de tiempos mostrados en la figura 4.1, se observa la expresión de la proteína recombinante en este medio de cultivo. En el gel de SDS-PAGE, el carril correspondiente a las 3 horas después de la inducción, muestra un máximo de expresión de la proteína de fusión. La banda en el gel encerrada en el rectángulo, corresponde al peso calculado de

7.5 kDa de la proteína de fusión diseñada. Estas condiciones fueron encontradas después de realizar el protocolo adecuado para la lisis celular y la solubilización de los cuerpos de inclusión (sección 4.1.4) a las muestras tomadas.



**Figura 4.1.** Gel de SDS-PAGE de la expresión en medio LB. El recuadro encierra el máximo de expresión localizado a las 3 horas después de inducir con IPTG. La proteína de fusión de la DEF4 tiene un peso de 7.5 kDa. Inducción a 30°C y 1 mM de IPTG.

Después de 3 horas de inducción, se comenzó con el protocolo para aislar y purificar la proteína de fusión producida en 1 L de medio LB. El carril A3h muestra una alícuota de 10  $\mu$ L cargada al gel proveniente de los 20 mL en los cuales se solubilizaron los cuerpos de inclusión de 1 L de cultivo. Este carril prueba la presencia de la proteína de fusión en el cultivo.

La proteína producida en este medio de cultivo fue utilizada para llevar a cabo los experimentos de plegamiento y la optimización de gradientes en la purificación por HPLC.

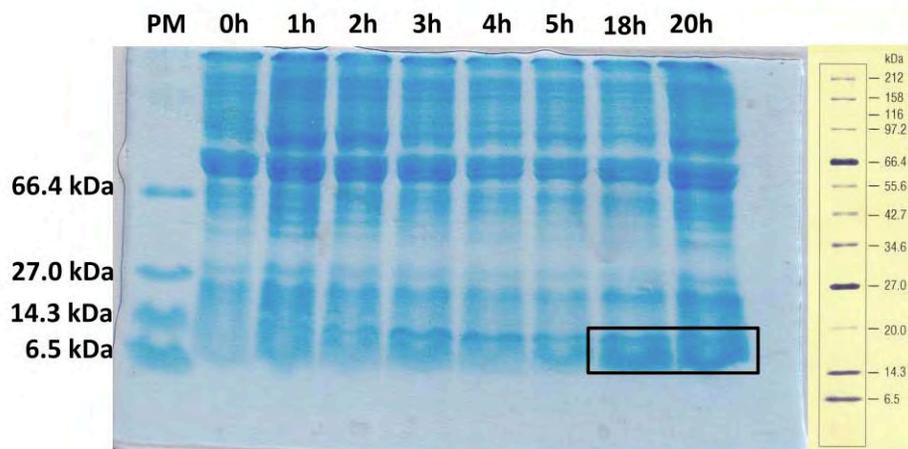
### 4.1.3 CONDICIONES PARA EXPRESIÓN EN MEDIO MÍNIMO

Para enriquecer con isótopos activos en RMN a la proteína bajo estudio es necesario crecérarla en medio mínimo, con compuestos enriquecidos en núcleos con espín  $\frac{1}{2}$ . Para enriquecer con  $^{13}\text{C}$  se crece al microorganismo con glucosa marcada con  $^{13}\text{C}$  como única fuente de carbono; para marcar con  $^{15}\text{N}$  se crece a la bacteria en cloruro de amonio como única fuente de nitrógeno. Se trabajó con las 2 técnicas descritas en el diseño experimental. Para las pruebas con estas técnicas de cultivo, no se utilizaron reactivos

enriquecidos en isótopos de  $^{13}\text{C}$  y  $^{15}\text{N}$ ; estos se utilizan hasta obtener las condiciones experimentales óptimas para la expresión.

#### 4.1.3.1 REDUCCIÓN DE VOLUMEN

Un litro de medio LB con una densidad óptica a 600 nm igual a 0.7 a 37°C fue centrifugado (5'000 x g durante 15 minutos) para retirar el medio de cultivo mencionado. El paquete celular fue resuspendido en la disolución amortiguadora de fosfatos del medio M9. Nuevamente, se centrifugó (5'000 x g durante 15 minutos) y ahora resuspendido en 250 mL de medio mínimo M9. El cultivo fue incubado, a 37°C, durante una hora, para permitir la adaptación celular al nuevo medio de cultivo. Después de transcurrido este tiempo, la expresión se indujo mediante la adición de IPTG. Este proceso se monitoreo por SDS-PAGE (figura 4.2), la cual muestra un máximo de expresión entre las 18 y 20 horas, después de la adición de IPTG al medio de cultivo.



**Figura 4.2. Monitoreo de la expresión en medio mínimo concentrando células. El máximo de expresión fue identificado entre las 18 y 20 horas después de hacer la inducción con IPTG.**

Existen diversos factores que afectan la producción de proteínas recombinantes en medio mínimo. En el medio mínimo sin modificaciones (M9), los tiempos de crecimiento celular son demasiado largos comparados con los obtenidos en otros medios de cultivo como el LB. Los tiempos de crecimiento generan productos con efectos citotóxicos y otros con efectos inhibitorios del crecimiento, afectando la expresión de proteínas.<sup>(32; 33)</sup> Por otra parte, en el medio M9 la creación de la biomasa necesaria para inducir la expresión de la

proteína objetivo se realiza a partir de reactivos enriquecidos, disminuyendo su aprovechamiento. Estas dificultades son subsanadas con la implementación de la técnica de reducción de volumen.

Para acortar el tiempo de incubación, minimizar la formación de productos citotóxicos y promover el crecimiento de las células bacterianas, responsables de la biosíntesis sin utilizar reactivos enriquecidos, se inoculan e incuban las células en medio LB hasta la densidad óptica a la cual en *E. coli* normalmente se induce la expresión. La incubación previa en medio LB permite el desarrollo de células y la minimización en el consumo de reactivos enriquecidos en  $^{13}\text{C}$  y  $^{15}\text{N}$  en la producción de masa celular. Los efectos citotóxicos se evitan con el cambio de medio de cultivo a un medio fresco, sin sustancias inhibitorias del crecimiento y la expresión.

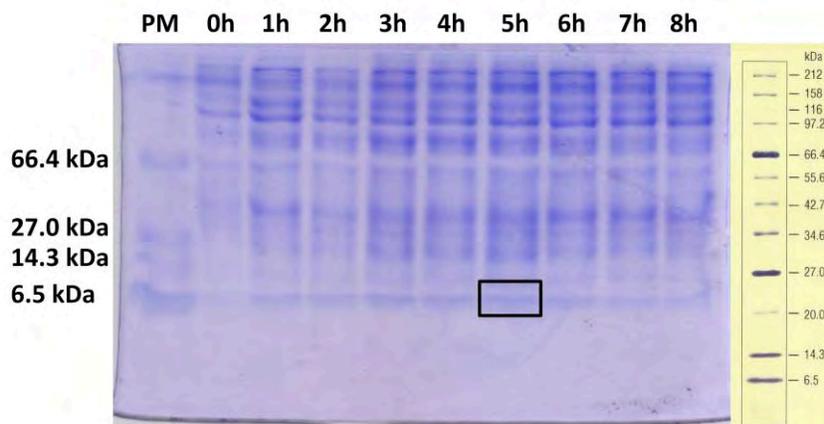
Al intercambiar el cultivo bacteriano del medio de cultivo LB al medio mínimo ocurre un periodo de adaptación, en el cual las células identifican las fuentes nutrimentales del medio de cultivo y sintetizan el equipo de enzimas necesarias para su aprovechamiento. Después de la etapa de adaptación (fase lag) la bacteria entra en la fase log del crecimiento bacteriano, en donde las células comienzan a aprovechar los nutrimentos del medio de cultivo en la biosíntesis de los compuestos necesarios para su desarrollo y reproducción. Con el tiempo de adaptación al medio mínimo, se espera que las células viables para aprovechar los nutrimentos sean las mejores en términos de eficiencia para la biosíntesis de proteínas.

La alta concentración celular al momento de la inducción tiene como consecuencia la existencia de muchos sistemas productores que aprovechan de manera eficiente las fuentes nutrimentales en la producción de proteínas, esto incrementa el rendimiento de la expresión al inducirla con IPTG.<sup>(33)</sup>

#### **4.1.3.2 MEDIO PG**

En el medio PG están optimizadas las concentraciones de reactivos enriquecidos en el medio de cultivo para su óptimo aprovechamiento en el enriquecimiento isotópico.<sup>(32)</sup> En este medio, se realizó la inducción a 37°C con IPTG, al momento que el cultivo alcanzó un

valor de densidad óptica a 600 nm de 0.7. Al igual que en el método de reducción de volumen, la temperatura se mantuvo en 37°C para evitar un alargamiento excesivo de la expresión. El monitoreo de la producción de la proteína de fusión se muestra en la figura 4.3.



**Figura 4.3. Monitoreo de la expresión en medio mínimo PG. El recuadro encierra el máximo de expresión localizado a las 5 horas después de la inducción a 37°C con 1 mM de IPTG.**

El método PG implementa una adaptación previa de las células bacterianas al medio con el cultivo semilla, de forma análoga a la descrita anteriormente. La realización del cultivo semilla permite la proliferación de células adaptadas y preparadas para aprovechar los nutrientes del medio mínimo al momento de inducir la expresión. Prueba de ello es el corto tiempo que le toma a las bacterias utilizadas alcanzar un valor de 0.7 de densidad óptica, después de colocar el cultivo semilla al cultivo en donde se realiza la inducción de la expresión (2 – 3 horas). Esta técnica, a diferencia de la anterior para enriquecimiento isotópico, no tiene una mejora significativa en los rendimientos de la expresión. Se ha reportado como una mejora en el aprovechamiento de los reactivos.<sup>(32)</sup>

#### **4.1.4 LISIS CELULAR Y SOLUBILIZACIÓN DE LOS CUERPOS DE INCLUSIÓN**

De todas las inducciones realizadas se aisló a la DEF4 centrifugando el cultivo a 5'000 x g durante 20 minutos para separar la células del medio de cultivo. Los paquetes celulares fueron resuspendidos en la disolución amortiguadora A (Apéndice G) para, posteriormente, ser lisados con un proceso de cambios de temperatura. La muestra se

sumerge en una mezcla de hielo seco y etanol y, posteriormente, en hielo. Este proceso se repite por 5 ciclos. Complementado el proceso de lisis, se realizó la sonicación del paquete celular (7 golpes sónicos de 30 segundos a 45-60 watts de potencia cada uno, con 2 minutos de incubación en hielo entre cada golpe). Las células lisadas fueron centrifugadas a 15'000 x g durante 30 minutos para separar y aislar los cuerpos de inclusión formados en la sobreexpresión de la proteína de fusión. El paquete formado después de centrifugar el lisado celular contiene los cuerpos de inclusión solubilizados con ayuda de la disolución amortiguadora E (Apéndice G) mediante acción mecánica (pipeteo y 7 golpes sónicos idénticos a los aplicados en la lisis celular). La urea presente en la disolución amortiguadora E actúa sobre los cuerpos de inclusión rompiendo las interacciones que dan origen a estos agregados proteicos, desnaturalizando el plegamiento adquirido por las proteínas y, por consiguiente, solubilizando los cuerpos de inclusión. La proteína de fusión soluble se purificó y sometió a condiciones para permitir el replegamiento, para el posterior análisis por RMN.

## **4.2 PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE**

### **4.2.1 CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD METAL QUELATO**

La proteína de fusión fue separada de la mezcla de proteínas resultante de la lisis celular y posterior solubilización de los cuerpos de inclusión aprovechando la afinidad que le confiere las 6 histidinas en su secuencia aminoácidos por el ion  $Ni^{2+}$ . El ión se fija a la fase estacionaria de la columna especializada para la separación de mezclas de proteínas Hi-Trap®. Las proteínas que exhiben afinidad por el  $Ni^{2+}$  son retenidas al pasar la mezcla por la columna, la afinidad de las proteínas retenidas se modulada variando el pH utilizando las disoluciones amortiguadoras E, F y G. La afinidad de la proteína de fusión por los iones  $Ni^{2+}$  es alta a pH 8. Al ir bajando el valor del pH gradualmente la proteína pierde afinidad por el ión fijo la fase estacionaria y sale de la columna. Se emplearan disoluciones amortiguadoras con urea 8 M, para evitar el riesgo que las proteínas se agreguen nuevamente, dificultando su purificación.<sup>(37)</sup> La proteína aislada de los cuerpos de

inclusión fue sometida a la reacción de reducción de puentes disulfuro y permitir su posterior plegamiento.

#### **4.2.2 DESNATURALIZACIÓN Y PLEGAMIENTO *IN VITRO***

Una vez aislada la proteína de fusión por afinidad metal quelato, se incrementa el pH a 8.0 y se añade DTT hasta alcanzar una concentración 100 mM en la disolución. El DTT reduce los grupos tiol de las cisteínas, en consecuencia, rompe todos los puentes disulfuro que se pudieron haber formado. La proteína se deja incubando por dos horas, después de las cuales la muestra se carga en una columna de exclusión de peso molecular PD-10 (GE Healthcare) equilibrada con la disolución amortiguadora G. Este proceso separa el DTT de la proteína. Debido al bajo pH de la disolución G, los grupos tiol de las cisteínas tienden a permanecer protonados, reduciendo la posibilidad de que sean oxidados por el oxígeno del aire.

Para iniciar el plegamiento es necesario reducir la concentración de urea, lo cual se logra diluyendo la proteína reducida aproximadamente 100 veces. La disolución amortiguadora en la que se diluye la muestra mantiene un pH de 8, lo cual fomenta la formación de puentes disulfuro, ya que ésta empieza con un ataque nucleofílico del grupo tiolato. Además, la disolución contiene el par redox cistina/cisteína en concentración 0.5 mM y 5.0 mM respectivamente, que promueve el rearrreglo de los puentes disulfuro, así como arginina 0.6 M la cual evita la co-agregación de las proteínas, según se ha observado. Finalmente, esta reacción fue puesta en agitación entre 12 y 16 horas a temperatura ambiente para restablecer el equilibrio redox entre cisteínas oxidadas y reducidas, el cual inicialmente se encuentra desplazado debido a una mayoría casi absoluta de cisteínas en su forma reducida en la disolución. Con esta estrategia se espera que la proteína forme los puentes disulfuro intramoleculares más estables y tome el plegamiento esperado. A continuación, los productos de la reacción se separaron por técnicas cromatográficas.

### **4.2.3 PURIFICACIÓN POR HPLC**

La purificación de la proteína de fusión finaliza con cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). Para realizar la purificación se utilizaron como disolventes H<sub>2</sub>O y acetonitrilo (AcN), ambos con ácido trifluoroacético (TFA) al 0.05% v/v. La corrida cromatográfica se monitoreó con lámpara de deuterio calibrada a 230 nm, región del espectro donde se detecta la presencia del enlace peptídico. A esta longitud de onda se detecta la presencia de proteínas en la disolución. Se aisló y caracterizó el pico principal de los cromatogramas mostrados en la figura 4.4, permitiendo evaluar la eficiencia de la reacción de plegamiento.

Se puede inferir el tipo de proteínas que serán retenidas por la columna (C18 de fase reversa). Las proteínas totalmente desnaturalizadas poseen mayor superficie hidrofóbica respecto a las proteínas plegadas del mismo peso molecular. La interacción entre la superficie hidrofóbica de cada proteína con la fase estacionaria permite fraccionar la mezcla de plegamientos obtenidos en la reacción de la sección anterior aún cuando tengan el mismo peso molecular y la misma secuencia de aminoácidos.<sup>(51)</sup>

Para la proteína de fusión replegada se probaron distintos gradientes (cambios en la composición de la fase móvil) con los disolventes mencionados. El gradiente optimizado comienza en 20% de la composición de la fase móvil en AcN y el resto de H<sub>2</sub>O, ambos disolventes con TFA al 0.05% v/v. Al inicio de la corrida cromatográfica las partículas afines a la columna son retenidas acorde a su naturaleza hidrofóbica. La elución de las partículas retenidas, en este caso proteínas, se realiza aumentando el porcentaje de composición en AcN de la fase móvil. La incursión del TFA mejora la separación de proteínas por HPLC. El TFA interacciona con los grupos cargados presentes en la fase estacionaria anulando los efectos que estos tienen en la separación. Además, interactúa con las proteínas acrecentando su carácter hidrofóbico.<sup>(39)</sup> El TFA aumenta la interacción entre las proteínas y la fase estacionaria permitiendo una mejor separación de la mezcla de péptidos.<sup>(39)</sup>

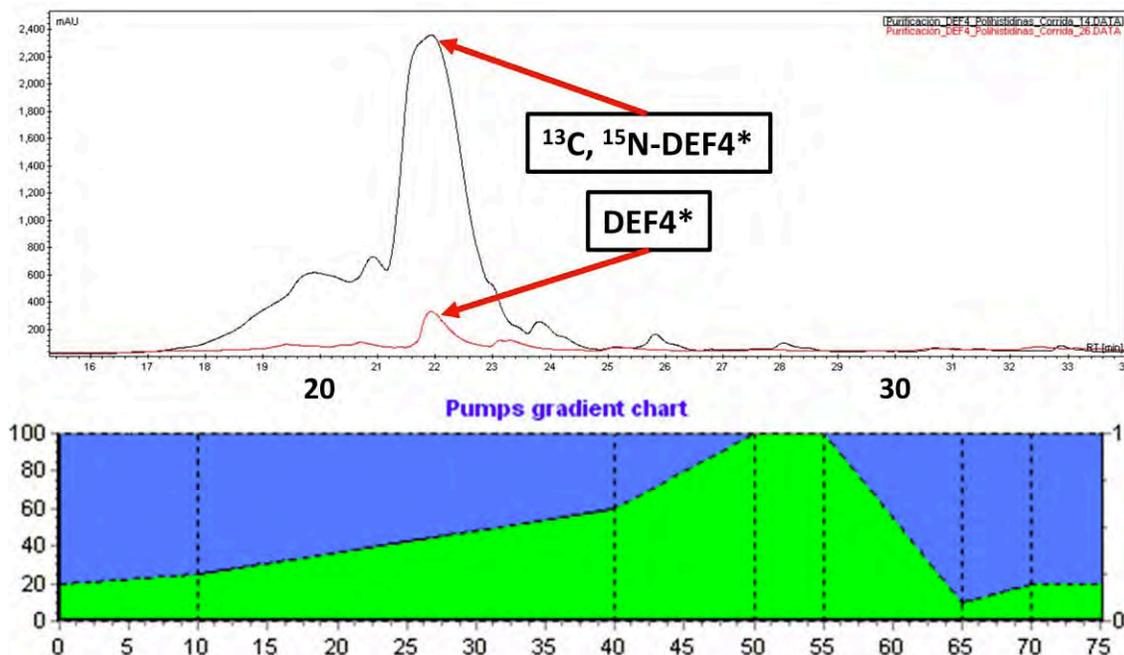


Figura 4.4. Cromatogramas y gradiente utilizado en la purificación por HPLC de la proteína de fusión. En la parte inferior de la figura se muestra el gradiente utilizado, de verde la cantidad de acetonitrilo y de azul la cantidad de  $\text{H}_2\text{O}$  que constituyen la fase móvil (flujo =  $1\text{ mL/min}$ ). El gradiente inicia en 20 % de acetonitrilo. En la parte superior de la figura se observan los cromatogramas de las muestras purificadas por HPLC.

En la figura 4.4 se muestra el resultado de la separación cromatográfica de la mezcla de proteínas de fusión replegadas enriquecida en  $^{13}\text{C}$  y  $^{15}\text{N}$  (muestra obtenida por la Dra. Acely Garza) y de la proteína de fusión sin marcaje isotópico ( $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N-DEF4}$  y DEF4 con isotopos naturales, respectivamente). El gradiente utilizado se muestra en la parte inferior de la figura antes mencionada. El tiempo de retención de ambos picos señalados en la figura corresponde a 22 minutos. Los compuestos con el tiempo de retención señalado fueron aislados y se analizaron por espectroscopia de masas, para encontrar consistencia entre la masa de la muestra y la masa calculada para la proteína de fusión.

La cercanía de sustancias al producto mayoritario de la reacción de plegamiento en los cromatogramas mostrados, permite considerar la existencia de péptidos que tomaron distintos plegamientos y exhiben diferentes superficies hidrofóbicas, la cual modifica el tiempo de retención por la forma en que interactúan con la fase estacionaria. Esto puede ser demostrado por un análisis de masas de cada pico alrededor del tiempo de retención del producto mayoritario. Sin embargo, estas muestras no fueron colectadas ni

caracterizadas, el trabajo se centro en la caracterización del pico y producto mayoritario del replegamiento.

### 4.3 CARACTERIZACIÓN

#### 4.3.1 ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Para confirmar el aislamiento de la proteína de fusión correcta se realizó un análisis por espectrometría de masas los picos aislados por HPLC con un tiempo de retención de 22 minutos (figura 4.4). Los resultados del análisis se encuentran enlistados en la tabla 4.1.

Tabla 4.1. Resultados del análisis por espectrometría de masas a los muestras aisladas por HPLC.

Muestra	Masa calculada [g/mol] <sup>(52)</sup>	Masa experimental [g/mol]
<sup>13</sup> C, <sup>15</sup> N-DEF4	7'952.4	7'935.3

Para el cálculo del peso de la proteína se considera la presencia de las cisteínas en su forma reducida (grupo SH). Al formarse un puente disulfuro (3 presentes en la DEF4) se elimina un par de átomos de hidrógeno, por tanto, cada puente formado representa una pérdida de 2 unidades de masa (2 veces la masa promedio del hidrógeno).

El cálculo del peso para la muestra enriquecida considera el 100% de presencia de isótopos de <sup>13</sup>C y <sup>15</sup>N. Considerando la formación de 3 puentes disulfuro, la variación del resultado de la masa experimental respecto al cálculo es de 11 unidades. La variación señalada representa el porcentaje de enriquecimiento isotópico de la muestra, es decir, la muestra fue enriquecida casi en su totalidad. En promedio 11 del total de átomos de <sup>12</sup>C y <sup>14</sup>N que constituyen a la proteína de fusión, no fueron sustituidos por los isótopos correspondientes. Es difícil establecer el porcentaje de enriquecimiento par cada isótopo en una muestra doblemente enriquecida.

### 4.3.2 MÁXIMO DE ABSORCIÓN EN LA REGIÓN DE UV

A la muestra antes de ser purificada por HPLC se le monitoreo la absorción en la región UV. La medición tuvo como resultado un máximo de absorción en 276 nm (0.405). Con este máximo se puede realizar el cálculo de la cantidad de proteína, si se cuenta con el coeficiente de extinción molar de la proteína a esta longitud de onda. El coeficiente teórico de extinción molar a 280 nm ( $5960 \text{ M}^{-1} \pm 10 \%$ ) se calculó a través del servidor ExPASy.<sup>(53)</sup> El servidor reporta que los cálculos con proteínas sin la presencia de triptófano en la secuencia de aminoácidos (Trp, W), presentan un error cercano al 10%.<sup>(53)</sup> Sin embargo puede realizarse un estimado de la cantidad de proteína plegada con la absorción y el coeficiente de extinción molar calculado a 280 nm. Los resultados se enlistan en la tabla 4.2.

**Tabla 4.2. Cálculo del rendimiento por UV. El cálculo se realizó con coeficiente de extinción molar obtenido en el servidor ExPASy.<sup>(53)</sup>**

Coeficiente de extinción molar $\epsilon$ [ $\text{M}^{-1}$ ] <sup>(53)</sup>	Concentración $C=A/\epsilon$ [ $\text{M} \times 10^{-5}$ ]	Factor de Dilución (10 mL/1000 mL)	Rendimiento de la expresión [ $\text{mg/L}$ ]*
$5960 \pm 10 \%$	6.61	<b>0.01</b>	4.98

\* *mg de proteína por litro de cultivo*

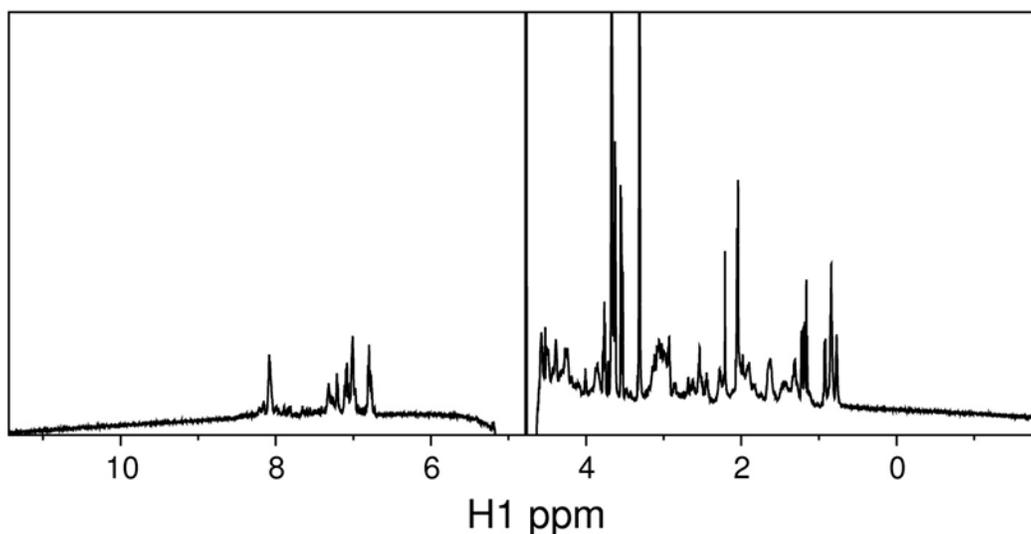
$A_{280\text{nm}} = 0.394$ ; **Peso molecular de la PF\* = 7526.5 g/mol**

El factor de dilución de la tabla 4.2 corresponde al volumen de donde se extrajo la alícuota de 1 mL (concentrado de la reacción de plegamiento) entre el volumen del cultivo, de donde se obtuvo la proteína de fusión. Hay que resaltar que el resultado aún es aproximado y para establecer con certeza el rendimiento de la expresión se necesitan de los pesos de las muestras obtenidas y la reproducibilidad del método.

### 4.4 RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

Dos muestras de DEF4, una de ellas marcada con  $^{15}\text{N}$ , fueron analizadas por RMN para evaluar los resultados de la reacción de plegamiento oxidativo *in vitro*.

El espectro 1D de la DEF4 que se muestra en la figura 4.5 corresponde a una muestra sin marcaje isotópico. En dicho espectro se pueden observar las señales correspondientes a los protones presentes en la proteína analizada.



**Figura 4.5.** Espectro de  $^1\text{H}$  correspondiente a la muestra de DEF4 sometida a la reacción de plegamiento. En la figura se distinguen todas las señales de protón correspondientes a la muestra de DEF4 obtenida con las técnicas experimentales descritas.

En el espectro de la figura 4.5 puede observarse la región correspondiente a los  $\text{H}_\text{N}$ , en una ventana espectral de 8.2 a 6.8 ppm. Debido al gran número de protones presentes en una proteína, las señales en el espectro 1D se observan muy superpuestas, por lo que generalmente se procede a preparar una muestra marcada con  $^{15}\text{N}$  para separar las señales en la dimensión de nitrógeno. El  $^{15}\text{N}$ -HSQC (figura 4.6) es el experimento más utilizado en la RMN de proteínas para monitorear el plegamiento y en él se observa una señal para cada protón que está unido a un átomo de nitrógeno; exceptuando prolina, todos los aminoácidos contienen al menos un enlace de este tipo. Como se ha descrito en la sección 2.5.2, el desplazamiento químico es un parámetro que depende directamente del entorno electrónico en el cual se encuentra el átomo analizado. En proteínas con una estructura definida cada átomo tiene un entorno electrónico específico y diferente al resto, por lo que presenta un desplazamiento químico característico. En las proteínas que no tienen una estructura definida, estos desplazamientos se asemejan mucho a los que tienen los átomos en el aminoácido aislado.<sup>(54)</sup>

En el caso de la DEF4 la dispersión descrita en la sección 2.5.3 para proteínas plegadas, no se observa en el espectro  $^{15}\text{N}$ -HSQC de la figura 4.6. En la figura se encuentran encerradas en el rectángulo punteado las señales debidas a las conectividades entre el isótopo  $^{15}\text{N}$  y los  $\text{H}_\text{N}$  de las cadenas laterales pertenecientes a los residuos de arginina, asparagina y glutamina. Fuera del rectángulo se encuentran las conectividades entre los protones  $\text{H}_\text{N}$  y los isótopos de  $^{15}\text{N}$  de la cadena principal. Las conectividades de los  $^{15}\text{NH}$  que corresponden a los anillos de imidazol en las histidinas se encuentran entre las señales de los protones de amida. La dispersión de señales de los protones de amida  $\text{H}_\text{N}$  en la dimensión de protón, tiene un intervalo de 7.5 a 8.6 ppm. La dispersión presentada por esta proteína en apenas mayor a una parte por millón.

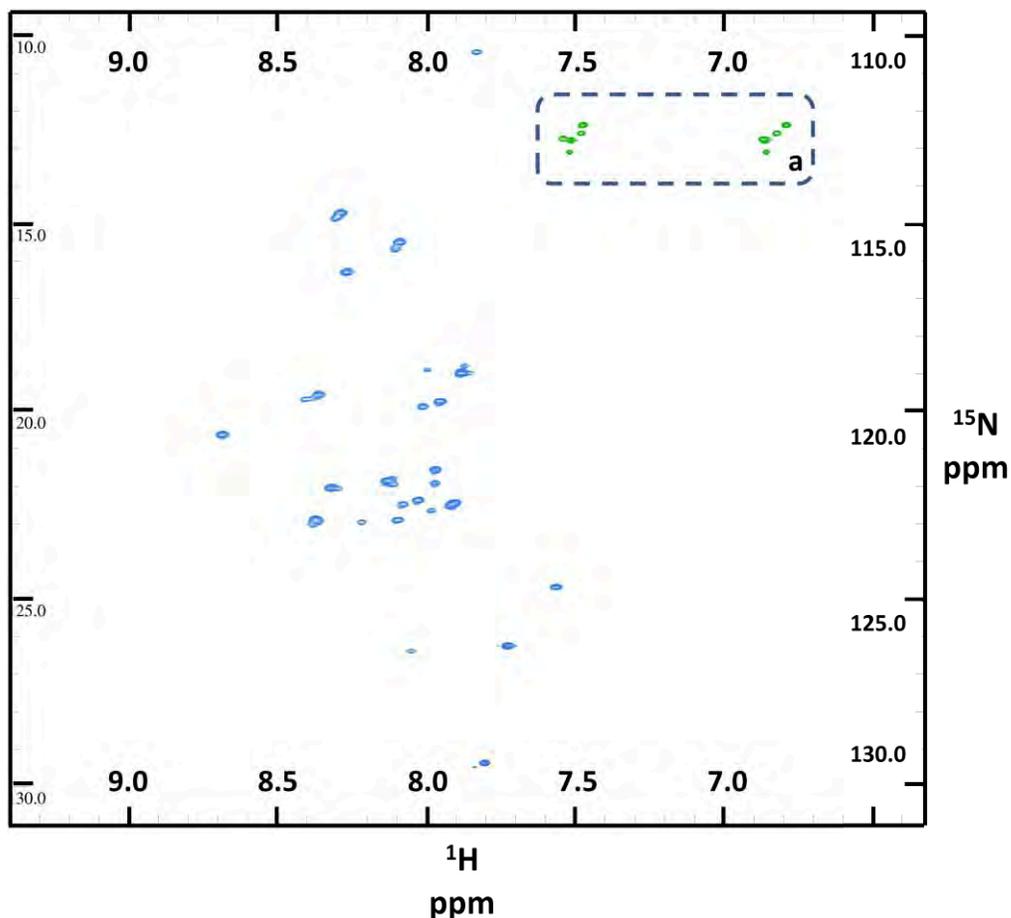
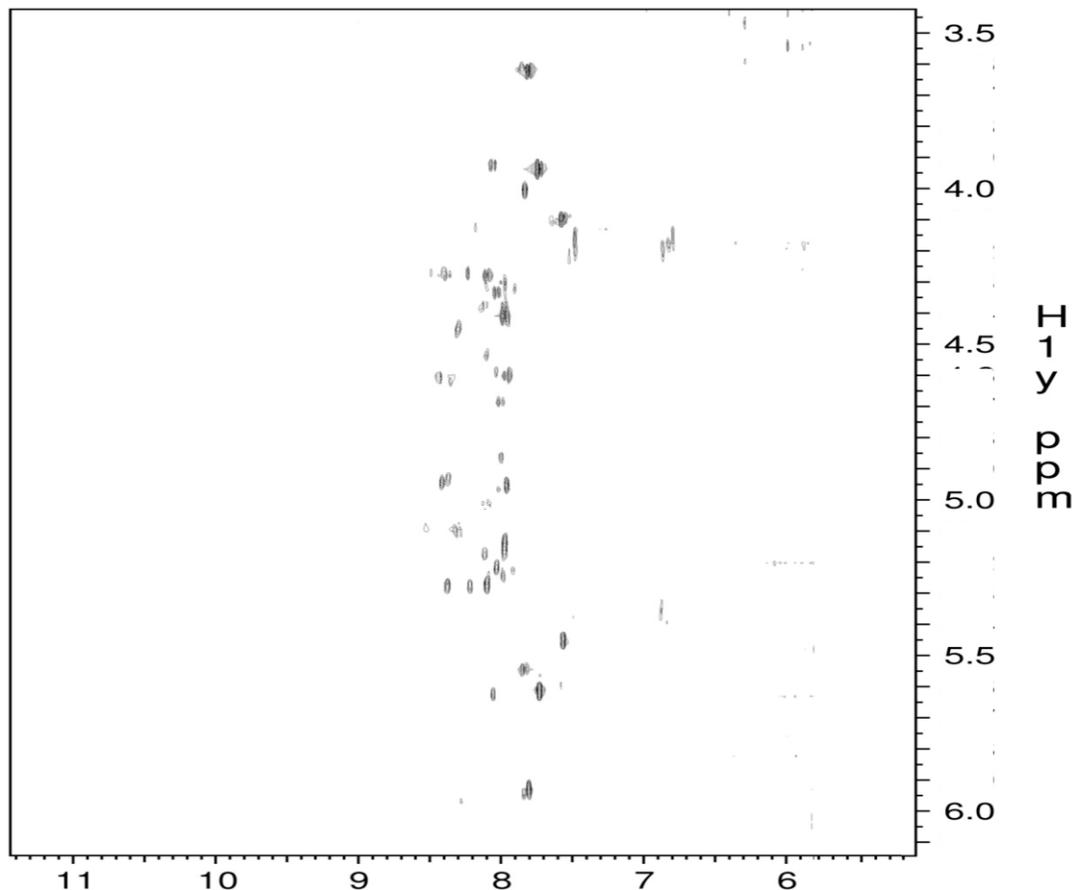


Figura 4.6. Espectro  $^{15}\text{N}$ -HSQC de la DEF4. Se observan todas las correlaciones entre  $\text{H}_\text{N}$  y  $^{15}\text{N}$ , por ejemplo, en el rectángulo punteado (a), se observan los grupos  $^{15}\text{NH}$  presentes en las cadenas laterales de los residuos de argininas, asparaginas, y glutaminas. Este espectro no muestra la dispersión de señales esperada para una proteína plegada.

El criterio descrito permite establecer que la proteína expresada no se encuentra plegada (estableciendo los puentes disulfuro descritos en la figura 2.1). Los resultados obtenidos indican que la reacción para la formación de los puentes disulfuro y plegamiento de la proteína no han logrado su objetivo, ya que los puentes disulfuro en esta proteína en un muy alto porcentaje es responsable del plegamiento nativo. Esta reacción debe ser replanteada para obtener el plegamiento de la proteína.



**Figura 4.7.** Expansión del espectro NOESY de la DEF4. Se observan las correlaciones a través del espacio de los protones de amida  $^1\text{H}_\text{N}$  y los protones adyacentes como los protones alfa de los aminoácidos  $^1\text{H}_\alpha$ . La poca dispersión de los  $\text{H}_\text{N}$  de amida se reafirma en este espectro.

El espectro de la figura 4.7 corresponde a una expansión del espectro NOESY de la DEF4. La región amplificada muestra las conectividades a través del espacio de los portones alfa de los aminoácidos (de 3.5 a 6.0 ppm) y protones adyacentes con los protones  $^1\text{H}_\text{N}$  de amida (de 6.8 a 8.6 ppm).

Para llevar a cabo el análisis minucioso y determinación estructural por RMN es vital contar muestras de proteínas que posean el plegamiento adecuado. Los resultados obtenidos con las muestras obtenidas pueden utilizarse de referencia para hacer un monitoreo del plegamiento y plantear modificaciones a la estrategia de plegamiento.

#### 4.4.1 MODELAJE POR HOMOLOGÍA DE LA DEF4

En ausencia de la estructura tridimensional experimental de una proteína, es posible hacer un modelaje por homología para tener una idea de su conformación. Para encontrar si existen estructuras que cumplan con por lo menos 30% de similitud con la DEF4 se realizó una búsqueda en la base de datos del Protein Data Bank (PDB) utilizando la secuencia de aminoácidos de la DEF4 y el programa BLAST-protein en el servidor del National Center for Biotechnology Information (NCBI). Se hallaron dos estructuras con alta homología: La defensina MGD-1 del mejillón mediterráneo *Mytilus galloprovincialis* (código PDB: 1FJN) con una 63% de la secuencia idéntica a la de la DEF4 y la de una defensina del ostión *Crassostrea gigas* (2B68), con el 55% de su estructura primaria idéntica a la de DEF4. La estructura de la defensina MGD-1<sup>(56)</sup> se eligió para hacer el modelaje de la DEF4 porque esta es la que guarda un porcentaje mayor de homología en la secuencia primaria.

Una vez encontrada una proteína plantilla adecuada, el siguiente paso es alinear la secuencia de la proteína plantilla con la de la proteína que se desea modelar. En general es necesario utilizar programas específicos para este fin, pero debido al pequeño tamaño y a la alta similitud entre estas dos defensinas, fue posible alinearlas manualmente. El alineamiento se presenta en la figura 4.8.



Figura 4.8. Alineamiento de la secuencia primaria de la DEF4 con la secuencia primaria de la proteína plantilla, la defensina MGD-1. Las columnas se encuentran coloreadas si los residuos correspondientes comparten características químicas semejantes o si son glicinas: azul cielo-hidrofóbico, turquesa-aromático, rojo-positivo, verde-polar, amarillo-prolina y rosa-puente disulfuro.

Una vez obtenido el alineamiento, se utilizó el programa Modeller<sup>(55)</sup> para calcular el modelo de la DEF4. Modeller calcula el modelo a base de intentar satisfacer “limitaciones espaciales” que extrae de la estructura de la proteína plantilla, estas limitaciones generalmente son de distancias y de ángulos. Por ejemplo, si la proteína plantilla y la proteína blanco comparten una arginina en la posición 13 (como es el caso entre DEF4 y MGD-1), Modeller mide los ángulos observados por dicho residuo así como las distancias entre sus átomos y los átomos de otros residuos aledaños e intenta calcular una estructura de la proteína blanco en donde estos ángulos y distancias sean semejantes a los encontrados para la proteína plantilla. El modelo de la DEF4 calculado por Modeller se presenta en la figura 4.9.

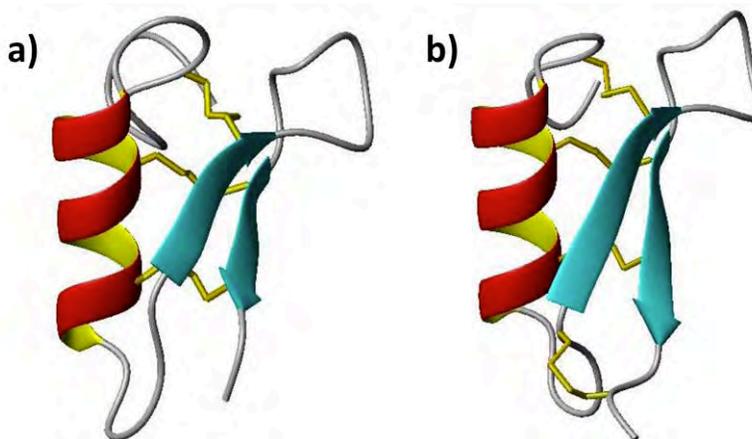


Figura 4.9. (a) Modelo por homología de la DEF4, calculado con Modeller<sup>(55)</sup> (b) Estructura tridimensional de la defensina MGD-1.

#### 4.5 RESUMEN DE RESULTADOS

Se logró la obtención de la proteína recombinante en la cepa Rosetta<sup>®</sup> de *E. coli* con el plásmido diseñado en el medio de cultivo LB y con las estrategias para expresiones en medio mínimo.

Los experimentos en medios mínimos permiten establecer condiciones para expresar la proteína de fusión con rendimientos aceptables. Las condiciones encontradas pueden

utilizarse para incorporar isótopos activos en RMN a la proteína recombinante con la bacteria y plásmido utilizados.

Las técnicas utilizadas para la expresión en medio mínimo se complementan para mejorar en la producción en medio mínimo de proteína recombinante, haciendo uso de la composición del medio PG e implementa el protocolo de la reducción de volumen.

El método para obtener, enriquecer y para la solubilización de los agregados formados en la sobre expresión de DEF4 recombinante con la cepa Rosetta® de *E. coli* es efectivo.

El péptido DEF4 se separó mediante el uso de cromatografía líquida de alta eficiencia en fase inversa empleando gradientes de acetonitrilo optimizados para este fin.

Los resultados de la espectroscopia de masas de las muestras aisladas por HPLC confirman el aislamiento de la proteína de interés.

El patrón caracterizado por la poca dispersión de las señales de protón de amida (en el intervalo de 7.5 a 8.7 ppm) en el espectro <sup>15</sup>N-HSQC de la DEF4, indica que la proteína no sigue el patrón característico de las proteínas plegadas y que guardan una estructura tridimensional característica. Por tanto la DEF4 no hay conseguido el plegamiento nativo.

## **5 CONCLUSIONES**

Es posible expresar en la cepa Roseta<sup>®</sup> de *E. coli* y aislar de cuerpos de inclusión DEF4 recombinante. Sin embargo, es necesario replantear las condiciones de plegamiento para conseguir la formación de los puentes disulfuro nativos, para posteriormente someter a la DEF4 a un estudio estructural.

## 6 REFERENCIAS Y BIBLIOGRAFÍA

1. *Defensins. Natural peptide antibiotics in human neutrophils.* Ganz, Tomas; Selsted, Michael E.; Szklarek, Dorothy; Harwig, Sylvia S. L.; Daher, Kathleen. 1985, Journal of Clinical Investigation, Vol. 76, págs. 1427 - 1435.
2. *Defensins in innate antiviral immunity.* Klotman, Mary E. y Chang, Theresa L. 2006, Nature Reviews, Vol. 6, págs. 447 - 456.
3. *Review. Antimicrobial peptides of multicellular organisms.* Zasloff, Michael. 2002, Nature, Vol. 415, págs. 389 - 395.
4. *Mammalian defensins in the antimicrobial immune response.* Selsted, Michael E. y Ouellette, Andre J. 2005, Nature Immunology, Vol. 6, págs. 551 - 557.
5. *Plant defensins - Prospects for the biological functions and biotechnological properties.* de Olivera Carvalho, André y Moreira Gomes, Valdirene. 2009, Peptides, Vol. 30, págs. 1007 - 1020.
6. *Human defensins as cancer biomarkers and antitumor molecules.* Droin, Nathalie; Jean-Baptiste, Hendra; Ducoroy, Patrick; Solary, Eric. 2009, Journal of Proteomics, Vol. 72, págs. 918 - 927.
7. *On the evolution of invertebrate defensins.* Rodríguez de la Vega, Ricardo Canek y Possani, Lourival D. 6, 2006, TRENDS in Genetics, Vol. 21, págs. 330 - 332.
8. *Novel interactions between K<sup>+</sup> channels and scorpion toxins.* Rodríguez de la Vega, Ricardo C.; Merino, Enrique; Becerril, Baltazar; Possani, Lourival D. 5, 2003, TRENDS in Pharmacological Sciences, Vol. 25, págs. 222 - 227.
9. *Antimicrobial peptides.* Clarke, D. J. y Campopiano, D. J. 2, 2006, Biochemical Society Transactions, Vol. 34, págs. 251-256.
10. *Review. Defensins: Antimicrobial peptides of innate immunity.* Ganz, Tomas. 2003, Nature Immunology, Vol. 3, págs. 710 - 720.
11. Defensins Knowledgebase. [En línea] Bioinformatics Institute (BII), Singapore, 06 de Abril de 2006. <http://defensins.bii.a-star.edu.sg/>.
12. *Structure, function, and membrane integration of defensins.* White, Stephen H., Wimley, William C. y Selsted, Michael E. 1995, Current Opinion in Structural Biology, Vol. 5, págs. 521 - 527.
13. *Defensins of vertebrate animals.* Lehrer, Robert I. y Ganz, Tomas. 2002, Current Opinion in Immunology, Vol. 14, págs. 96 - 102.
14. *Innate immunity: Isolation of several cysteine-rich antimicrobial peptides from the blood of a mollusc, Mytilus edulis.* Charlet, M.; Chernysh, S.; Philippe, H.; Hetru, C.; Hoffmann, J. A.; Bulet, P. 1996, Journal of Biological Chemistry, Vol. 271, págs. 21808 - 21813.
15. *Evidence for myxobacterial origin of eukaryotic defensins.* Zhu, Shunyi. 2007, Immunogenetics, Vol. 59, págs. 949 - 954.
16. *Discovery of six families of fungal defensin-like peptides provides insights into origin and evolution of the CS-alpha-beta defensins.* Zhu, Shunyi. 2008, Molecular Immunology, Vol. 45, págs. 828 - 838.
17. *Differential Antifungal and Calcium Channel-Blocking Activity among Structurally Related Plant Defensins.* Spelbrink, Robert G., Dilmac, Neljmic y Allen, Aron. 2004, Plant Physiology, Vol. 135, págs. 2055 - 2067.
18. *Functional and structural features of gamma-zeathionins, a new class of sodium channel blockers.* Kushmerick, Christopher; de Souza Castro, Mariana; Santos Cruz, Jáder; Bloch Jr, Carlos; Beirao, Paulo S.L. 1998, FEBS Letters, Vol. 440, págs. 302 - 306.

19. *Purification and characterization of a scorpion defensin, a 4 kDa antibacterial peptide presenting structural similarities with insects defensins and scorpion toxins.* **Cociancich, Stéphane; Goyffon, Max; Bontems, Francois; Bulet, Philippe.** 1993, Biochemical and Biophysical research Communications, Vol. 194, págs. 17 - 22.
20. *Avian antimicrobial peptides: the defense role of b-defensins.* **Sugiarto, Haryadi y Yu, Pak Lam.** 2004, Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol. 323, págs. 721 - 727.
21. *Structural conservation in prokaryotic and eukaryotic potassium channels.* **MacKinnon, R.; Cohen, S.; Kuo, A.; Lee, A.; Chait, B. T.** 1998, Science, Vol. 280, págs. 106 - 109.
22. *NMR spectroscopy: a multifaceted approach to macromolecular structure.* **Ferentz, Ann E. y Wagner, Gerhard.** 1, 2000, Quarterly Reviews of Biophysics, Vol. 33, págs. 29 - 65.
23. **Nelson, David L. y Cox, Michael M.** Amino Acids, Peptides and Proteins. *Principles of Biochemistry.* Fourth Edition. s.l. : Omega, 2005, 3, págs. 75 - 115.
24. **Alberts, Bruce; Bray, Dennis; Lewis, Julian; Raff, Martin; Roberts, Keith; Watson, James D.** *Biología Molecular de la Célula.* Tercera Edición en español. s.l. : Omega.
25. *Nobel Lecture: Studies on the Principles that Govern the Folding of Protein Chains.* **Anfinsen, Christian.** 1972.
26. **Madigan, Michael T, Martinko, John M y Parker, Jack.** *Biología de los microorganismos.* Décima. s.l. : Pearson Prentice Hall, 2003.
27. **Sambrook, Joseph y Russell, David W.** Molecular Cloning. Third Edition. 2001, Vol. III, 15, pág. 15.4.
28. *Studies of transformation of Escherichia coli with plasmids.* **Hanahan, Douglas.** 1983, Journal of Molecular Biology, Vol. 166, págs. 557 - 580.
29. *Use of T7 RNA Polymerase to Direct Expression of Cloned Genes.* **Studier, F. William; Rosenberg, Alan H.; Dunn, John J.; Dubendorff, John W.** 1990, Methods in Enzymology, Vol. 185, págs. 60 - 89.
30. *Use of Bacteriophage T7 RNA Polymerase to Direct Selective High-level Expression of Cloned Genes.* **Studier, F. William y Moffatt, Barbara A.** 1986, Journal of Molecular Biology, Vol. 189, págs. 113 - 130.
31. **Bodanszky, Miklos.** *Peptide Chemistry.* New York : Springer-Verlag, 1988.
32. *Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures.* **Studier, F. William.** 2005, Protein Expression and Purification, Vol. 41, págs. 207 - 234.
33. *A method for efficient isotopic labeling of recombinant proteins.* **Marley, Jonathan, Lu, Min y Bracken, Clay.** 2001, Journal of biomolecular NMR, Vol. 20, págs. 71 - 75.
34. *Review. Construction and deconstruction of bacterial inclusion bodies.* **Carrió, C. C. y Villaverde, A.** 2002, Journal of Biotechnology, Vol. 96, págs. 3 -12.
35. *Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation.* **Kopito, Ron R.** 2000, Trends in cell biology, Vol. 10, págs. 524 - 530.
36. *Renaturation of recombinant proteins produced as inclusion bodies.* **Fischer, Bernhard E.** 1994, Biotechnology Advances, Vol. 12, págs. 89 - 101.
37. *Protein aggregation as bacterial inclusion bodies is reversible.* **Carrió, M. Mar y Villaverde, Antonio.** 2001, FEBS letters, Vol. 489, págs. 29 - 33.
38. *Inhibition of Aggregation Side Reactions during in Vitro Protein Folding.* **De Bernardez Clark, Eliana, Schwarz, Elisabeth y Rudolph, Rainer.** 1999, Methods in Enzymology, Vol. 309, págs. 217 - 236.

39. **Cunico, Robert L., Gooding, Karen M. y Wehr, Tim.** *Basic HPLC and CE of Biomolecules*. Richmond, California : Bay Bioanalytical Laboratory, 1998.
40. *Nobel lecture: The Principle of Nuclear Induction.* **Bloch, Félix.** 1952.
41. *Nobel lecture: Research in Nuclear Magnetism.* **Purcel, Edwards Mills.** 1952.
42. **Wüthrich, Kurt.** *NMR of Proteins and Nucleic Acids*. First edition. Zürich : John Wiley & Sons, 1986.
43. **Friebolin, Horst.** *Basic One- and Two-Dimensional NMR Spectroscopy*. [trad.] Jack K. Becconsall. Third edition. Weinheim : Wiley-VCH, 1998.
44. **Keeler, James.** *Understanding NMR spectroscopy*. Cambridge : John Wiley & Sons, 2005.
45. *NMR-This Other Method for Protein and Nucleic Acid Structure Determination.* **Wüthrich, Kurt.** 1995, Acta Crystallographica, Vol. D51, págs. 249 - 270.
46. *Simple techniques for the quantification of protein secondary structure by 1H NMR spectroscopy.* **Wishart, D. S., Sykes, B. D. y Richards, F. M.** 1-2, 1991, FEBS Letters, Vol. 293, págs. 72 - 80.
47. *DNAWorks: an automated method for designing oligonucleotides for PCR-based gene synthesis.* **Hoover, D. M. y Lubkowski, J.** 10, 2002, Nucleic acids research, Vol. 30, pág. e43.
48. **Novagen.** pET System Manual. 11th Manual. 2005.
49. *Formation of recombinant protein inclusion bodies in Escherichia coli.* **Kane, James F. y Hartley, Donna L.** 1988, Trends in Biotechnology, Vol. 6, págs. 95 - 101.
50. *Optimization of Inclusion Body Solubilization and Renaturation of Recombinant Human Growth Hormone from Escherichia coli.* **Patra, Ashok K.; Mukhopadhyay, R.; Mukhija, R.; Krishnan, Anuja; Garg, L. C.; Panda, Amulya K.** 2000, Protein Expression and Purification, Vol. 18, págs. 182 - 192.
51. *Probing the disulfide folding pathway of Insulin-Like Growth Factor-I.* **Milner, Steve J.; Carver, John A.; Ballard, F. John; Francis, Geoffrey L.** 6, 1998, Biotechnology and Bioengineering, Vol. 62, págs. 693 - 703.
52. **Putman, Chris.** Protein Calculator. [En línea] 28 de Marzo de 2006. [Citado el: 1 de Abril de 2009.]
53. **Bioinformatics, Swiss Institute of.** ExpASy (Expert Protein Analysis System). [En línea] <http://www.expasy.ch/>. [Citado el: 21 de Agosto de 2009.]
54. *A residue-level investigation of the equilibrium unfolding of the C2A domain of synaptotagmin 1.* **Veerappan, Anbazhagan; Han-Min, Wang; Ching-Song, Lu; Chin, Yu.** 2009, Archives of Biochemistry and Biophysics, Vol. 490, págs. 158 - 162.
55. **Sali, Andrej.** [En línea] [http://salilab.org/modeller/about\\_modeller.html](http://salilab.org/modeller/about_modeller.html). [Citado el: 23 de Septiembre de 2009.]
56. *Solution structure and activity of the synthetic four-disulfide bond Mediterranean mussel defensin (MGD-1).* **Yang, Y S; Mitta, G; Chavanieu, A; Calas, B; Sanchez, J. F.; Roch, P.; Aumelas, A.** 39, 2000, Biochemistry, Vol. 47, págs. 14436 - 14447.
57. Protein Data Bank. *PDB*. [En línea] <http://www.pdb.org/pdb/cgi/explore.cgi?pdbId=1fjn>. [Citado el: 23 de Septiembre de 2009.]

## 7 APÉNDICES

### APÉNDICE A PROTOCOLOS DE EXPRESIÓN EN MEDIO MÍNIMO

#### EXPRESIÓN CON LA REDUCCIÓN DE VOLUMEN<sup>(33)</sup>

- I. Seleccionar una colonia aislada de una transformación reciente o desprender una hojuela de un stock de glicerol. Inocular 10 ml de medio LB. Crecer el cultivo incubando las células por 12-16 horas a 30°C con agitación. Este cultivo se puede dejar creciendo durante una noche. Al día siguiente se inocula un litro de medio LB.
- II. Crecer el cultivo por incubándolo a 37°C con agitación hasta que alcance un valor de densidad óptica de 0.7 a 600 nm. Alcanzado el valor de densidad óptica, centrifugar el cultivo, lavar con la disolución amortiguadora de medio mínimo resuspendiendo el paquete celular con 100 mL de disolución amortiguadora. Centrifugar de nuevo.
- III. Resuspender el paquete celular en  $\frac{1}{4}$  del volumen inicial con disolución amortiguadora de medio mínimo sin fuentes de carbono y nitrógeno. Dejar incubando por 1 hora a 37°C con agitación, para que el sistema de expresión recupere el crecimiento y produzca metabolitos sin enriquecimiento isotópico.
- IV. Después de la hora de incubación centrifugar. Resuspender el paquete celular nuevamente en medio mínimo con los nutrimentos señalados, si el marcaje es deseado, se añaden los reactivos enriquecidos isotópicamente.
- V. Resuspender, eh inducir la expresión con la adición de IPTG hasta una concentración de 1mM en el cultivo (para el monitoreo de la expresión **NO** usar reactivos enriquecidos).
- VI. Incubar a la temperatura óptima hasta que la producción de proteína sea máxima (es necesario el monitoreo de la expresión para determinar las condiciones óptimas de producción: tiempo y temperatura de inducción).
- VII. Centrifugar y se resuspender el paquete celular en disolución amortiguadora de lisis para liberar la proteína expresada o sí es el caso; liberar y posteriormente resuspender los cuerpos de inclusión formados.

---

## ENRIQUECIMIENTO ISOTÓPICO CON MEDIO PG<sup>(32)</sup>

### PREPARACIÓN DE LAS DISOLUCIONES AMORTIGUADORAS

Para llevarlo a cabo este método de enriquecimiento isotópico, como primer paso se prepara un litro de disolución amortiguadora con 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y 50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Este litro se divide en 2 partes iguales y se coloca cada una de las partes en un matraz para cultivo de 2000 ml. Estos son los **matraces preparativos** donde se expresará la proteína de interés. Es necesario preparar 100 mL adicionales de la disolución amortiguadora anterior para colocarla en un matraz de 250 o 500 mL. Esta disolución es la de los **cultivos semilla**. Estas disoluciones se esterilizan por autoclave.

### MEZCLA DE NUTRIENTES PREPARATIVOS (PARA LOS DOS MATRACES GRANDES; CON REACTIVOS ENRIQUECIDOS ISOTÓPICAMENTE O NO, DEPENDIENDO DEL EXPERIMENTO)

Estas disoluciones contienen las fuentes de carbono y nitrógeno que servirán como materia prima a la célula para la producción de la proteína de interés. Dichas fuentes pueden ser ricas o no en isótopos de <sup>15</sup>N y <sup>13</sup>C respectivamente, dependiendo si se quiere enriquecer en uno o ambos isótopos o el cultivo es un ensayo de la expresión u optimización de las condiciones para expresar proteína. Dichas disoluciones se preparan como a continuación se describe:

1. Pesar el equivalente a 0.025 moles de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en un tubo falcon de 50 mL conteniendo un agitador magnético, añadir 1 mL del stock de magnesio, 1 ml del stock de vitaminas, 1 mL del stock de metales. Finalmente añadir agua hasta alcanzar el volumen de 15 ml. Agitar hasta que el (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> se haya disuelto.
2. Pesar 5 g de glucosa, añadir al tubo falcon. Añadir H<sub>2</sub>O hasta alcanzar 40 ml de volumen y agitar hasta que la glucosa se haya disuelto.
3. Esterilizar por filtración, guardar a 4°C (si será utilizado al siguiente día) o congelar.
4. No añadir a los matraces hasta que sea tiempo de inocularlos con la célula adecuada.

## **MEZCLA DE NUTRIENTES SEMILLA (PARA LOS CULTIVOS SEMILLA; SIEMPRE SIN REACTIVOS ENRIQUECIDOS)**

Al igual que la mezcla nutritiva preparativa, esta mezcla contiene las fuentes de carbono y nitrógeno que servirán como materia prima para que la célula produzca la proteína de nuestro interés. La disolución se prepara de forma idéntica con la excepción que esta mezcla jamás llevará reactivos enriquecidos en  $^{15}\text{N}$  y/o  $^{13}\text{C}$ . La cantidad preparada de mezcla de nutrientes semilla es suficiente para 10 cultivos semilla. No se debe añadir a los matraces hasta que sea tiempo de inocularlos con la célula adecuada.

### **PROTOCOLO PG**

#### *Primer día*

1. Se selecciona una colonia bien aislada de una transformación fresca o una hojuela de un stock de glicerol. Se inoculan 10 ml de medio LB. Se crece el cultivo mediante la incubación de las células por 7-10 horas a 37°C con agitación.
2. Mientras el cultivo del paso 1 crece, se preparan los matraces semilla y preparativos, sin añadir los nutrientes.
3. Completado el paso 1 se centrifugan las células a 3'000 x g por 5- 0 minutos, se decanta el sobrenadante.
4. Se deben añadir los antibióticos apropiados y la mezcla de nutrientes al (los) matraz (ces) semilla.
5. El paquete celular obtenido en el paso 3 se resuspende en un poco de medio del matraz semilla a inocular, después se inocula el resto del medio con las células resuspendidas.
6. El cultivo se deja crecer por 12-16 horas (toda una noche) incubando a 30°C con agitación constante.

*Segundo día*

7. Al siguiente día se deben poner 45 mL del cultivo dentro de dos tubos falcon de 50 mL estériles para recolectar las células centrifugando los tubos falcon a 3'000 x g por 15 minutos, después se decanta el sobrenadante.
8. Mientras se completa el paso 7 se añaden los antibióticos adecuados y la mezcla nutritiva a los matraces preparativos.
9. Completado el paso 7 se resuspende el paquete celular de uno de los tubos falcon en un poco de volumen del medio preparativo, una vez resuspendido el paquete celular, se inoculara el resto del medio de uno de los matraces preparativos. Repetir con el otro falcon y el otro matraz preparativo.
10. Las células crecen incubando el cultivo a 37°C con agitación a 300 rpm hasta que la densidad óptica (DO) a 600 nm sea de 0.7 - 0.8 (usualmente 1 - 2 hrs).
11. Inmediatamente se induce la expresión añadiendo IPTG hasta alcanzar una concentración 1 mM en el medio de cultivo. Se deja que la expresión continúe por 4 - 16 horas (los valores de tiempo y temperatura óptimos de expresión deben ser determinados mediante el monitoreo de la expresión).

*Segundo/Tercer día*

12. Terminado el tiempo de expresión óptimo, se recolectan las células del cultivo centrifugándolo a 6'000 rpm por 20 minutos.
13. Se decanta el medio y el paquete celular se resuspende en disolución amortiguadora frío de 20 mM Tris, 300 mM NaCl, 10 mM imidazol, pH 8 (usualmente se resuspende en 10 - 20 mL de disolución amortiguadora).
14. Se procede con la lisis o congelamiento.

---

**APÉNDICE B COMPOSICIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO****MEDIO LURIA BERTANI (LB)**

Tripsina	10 g/L
Extracto de levadura	5 g/L
NaCl	10 g/L
pH	7.0

Mezclar los primeros tres componentes en 1 L de agua desionizada ó destilada y ajustar el pH de la disolución. Esterilizar por autoclave.

**MEDIO MÍNIMO M9**

Sales <b>5X</b> de medio M9	200.0 ml
Disolución de D-glucosa [20 g/100 ml] (Esterilizada por filtración) <sup>a</sup>	20.0 ml
Vitaminas ( <b>1000X</b> )	1.0 ml
MgSO <sub>4</sub> 1 M (Disolución esterilizado por autoclave)	2.0 ml
CaCl <sub>2</sub> 1 M (Disolución esterilizado por autoclave)	0.1 ml
Aforar con H <sub>2</sub> O desionizada o destilada	hasta 1 L
Ajustar el valor de <b>pH</b> a	7.00

Agregar el agua desionizada a la cantidad necesaria de Sales **5X** de medio M9 dejando el volumen necesario para los otros componentes que son agregados al momento de inocular el cultivo y que algunos no puedes ser esterilizados por autoclave (vitaminas, MgSO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub> y glucosa). Esterilizar por autoclave la mezcla de sales 5X y H<sub>2</sub>O.

**Sales 5 X M9**

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	15.0 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	64.0 g
NaCl	2.5 g
NH <sub>4</sub> Cl <sup>a</sup> (pH ajustado a 7.2 con NaOH)	5.0 g

Aforar a 1 litro de disolución. Esterilizar por autoclave.

**Disolución stock de vitaminas**

Cloruro de colina	1.0 g/l
Ácido Fólico	1.0 g/l
Ácido D-Pantoténico	1.0 g/l
Mio-inositol	2.0 g/l
Nicotinamida (Niacinamide)	1.0 g/l
Piridoxal HCl	1.0 g/l
Tiamine HCl	1.0 g/l
Riboflavin	0.1 g/l
D-Biotina	1.0 g/l

Guardar en alícuotas de 1 mL a -20°C  
(1mL de stock de vitaminas para 1 L de cultivo)

<sup>a</sup> Para enriquecimiento isotópico el NH<sub>4</sub>Cl y la D-glucosa son sustitutos por <sup>15</sup>NH<sub>4</sub>Cl y <sup>13</sup>C D-glucosa dependiendo del enriquecimiento isotópico deseado. Para la incorporación de deuterio, 75% de agua deuterada <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O se usa en lugar de agua desionizada para preparar la disolución.

**MEDIO MÍNIMO PG**

*Método diseñado para preparar un litro de cultivo.*

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	50 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	50 mM
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	25 mM
MgSO <sub>4</sub>	2 mM
Stock de Metales traza	1 mL
Stock de Vitaminas	1 mL
Glucosa	5 g/L

***Disolución stock de disolución amortiguadora (10X)***

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5 M
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.5 M

***Disolución stock de metales traza (1000X)***

FeCl <sub>3</sub> (en ~ 0.3 % HCl)	0.1 M	5.0 mL
CaCl <sub>2</sub>	0.2 M	1.0 mL
MnCl <sub>2</sub>	0.4 M	0.25 mL
ZnSO <sub>4</sub>	0.2 M	0.5 mL
CoCl <sub>2</sub>	0.1 M	0.2 mL
CuSO <sub>4</sub>	0.1 M	0.2 mL
NiSO <sub>4</sub>	0.1 M	0.2 mL
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.1 M	*0.2 mL

\*Disolver en H<sub>2</sub>O caliente

Agregar H<sub>2</sub>O hasta aforar 10 mL y esterilizar por filtración.

(1mL de stock de metales por litro de cultivo)

**Stock de magnesio (1000x)**

MgSO <sub>4</sub>	2 M
(1mL de stock de magnesio por litro de cultivo)	

**Disolución stock de Vitaminas**

Cloruro de colina	1.0 g/l
Ácido Fólico	1.0 g/l
Ácido D-Pantotenico	1.0 g/l
Mio-inositol	2.0 g/l
Nicotinamida (Niacinamide)	1.0 g/l
Piridoxal HCl	1.0 g/l
Tiamine HCl	1.0 g/l
Riboflavin	0.1 g/l
D-Biotina	1.0 g/l

Guardar en alícuotas de 1 mL a -20°C  
(1mL de stock de vitaminas por litro de cultivo)

**APÉNDICE C AMINOÁCIDOS EN LA NATURALEZA**

**Tabla 7.1. Los 20 aminoácidos comunes en la naturaleza. La tabla muestra la abreviatura (de una y tres letras) y la clasificación del grupo R acuerdo a su naturaleza química.<sup>(23)</sup>**

Nombre	Abreviatura		Clasificación del grupo R
	Una letra	Tres letras	
Alanina	<b>A</b>	ALA	Alifático NO polar
Glicina	<b>G</b>	GLY	Alifático NO polar
Isoleucina	<b>I</b>	ILE	Alifático NO polar
Leucina	<b>L</b>	LEU	Alifático NO polar
Metionina	<b>M</b>	MET	Alifático NO polar
Prolina	<b>P</b>	PRO	Alifático NO polar
Valina	<b>V</b>	VAL	Alifático NO polar
Fenilalanina	<b>F</b>	PHE	Aromático
Tirosina	<b>Y</b>	TYR	Aromático
Triptófano	<b>W</b>	TRP	Aromático
Aspartato	<b>D</b>	ASP	Cargado negativamente (-)
Glutamato	<b>E</b>	GLU	Cargado negativamente (-)
Arginina	<b>R</b>	ARG	Cargado positivamente (+)
Histidina	<b>H</b>	HIS	Cargado positivamente (+)
Lisina	<b>K</b>	LYS	Cargado positivamente (+)
Asparagina	<b>N</b>	ASN	Polar sin carga
Cisteína	<b>C</b>	CYS	Polar sin carga
Glutamina	<b>Q</b>	GLN	Polar sin carga
Serina	<b>S</b>	SER	Polar sin carga
Treonina	<b>T</b>	THR	Polar sin carga

---

**APÉNDICE D      PROTOCOLOS COMPETENCIA Y TRANSFORMACIÓN**

**COMPETENCIA**

- I. Seleccionar una colonia aislada e inocular 100 mL de medio LB en un matraz de 250 mL. Incubar con agitación a 37°C hasta alcanzar un valor de densidad óptica de 0.4 medido a 600 nm.
- II. Transferir el cultivo a dos tubos estériles de 50 mL e incubar en hielo por 10 min.
- III. Centrifugar durante 10 minutos a 4'000 x g a 4°C.
- IV. Decantar y eliminar el medio restante invirtiendo los tubos por 1 min.
- V. Resuspender cada paquete celular en 10 mL de CaCl<sub>2</sub> 0.1 M (estéril y previamente incubado en hielo) e incubar en hielo durante 10 min.
- VI. Centrifugar a 2'500 x g durante 5 minutos a 4°C. Desechar el sobrenadante.
- VII. Repetir el paso V y VI para un total de 3 incubaciones en cloruro de calcio.
- VIII. Resuspender cada paquete celular en 2 mL de CaCl<sub>2</sub> 0.1 M (frio y estéril).
- IX. Agregar 0.5 mL de glicerol al 50 % w/v a cada 2 mL de suspensión del paso anterior.
- X. Preparar alícuotas de 200 µL en tubos estériles con tapa de rosca y guardarlos a -80°C.

**TRANSFORMACIÓN**

- I. Tomar un tubo de células transformadas e incubarlo en hielo.
- II. Transferir 50 µL de células competentes a un tubo de microfuga de 1.5 mL.
- III. Añadir 5 µL del DNA plasmídico deseado para transformar, mezclar cuidadosamente con el tubo tapado.
- IV. Mantener en hielo durante 3º minutos.
- V. Transferir el tubo a un baño de agua a 42°C durante 90 segundos.
- VI. Regresar el tubo al hielo por 2 minutos.
- VII. Añadir 450 µL de medio LB o SOC e incubar las células durante 1 hora con agitación ocasional.

- VIII.** Tomar 50 – 100  $\mu$ L del cultivo y sembrarlo en una caja con medio LB sólido con los antibióticos apropiados.

**PREPARACIÓN DE STOCKS DE GLICEROL**

- I.** Seleccionar una colonia totalmente aislada de una caja con células recientemente transformadas e inocular 20 mL de medio LB con el (los) antibiótico(s) apropiado(s) en un falcon de 50 mL.
- II.** Incubar a 37°C con agitación hasta que el cultivo alcance una densidad óptica de 0.6 a 600 nm.
- III.** Mientras el cultivo alcanza el valor de densidad óptica, añadir 300  $\mu$ L de glicerol al 50 % w/v a un tubo con tapa de rosca de 2 mL y esterilizar por autoclave.
- IV.** Añadir 700  $\mu$ L del cultivo del paso 3 a los tubos del paso 4 y mezclar en un vortex. Guardar a – 80°C.

APÉNDICE E ESPECTRO DE MASAS DE  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ -DEF4

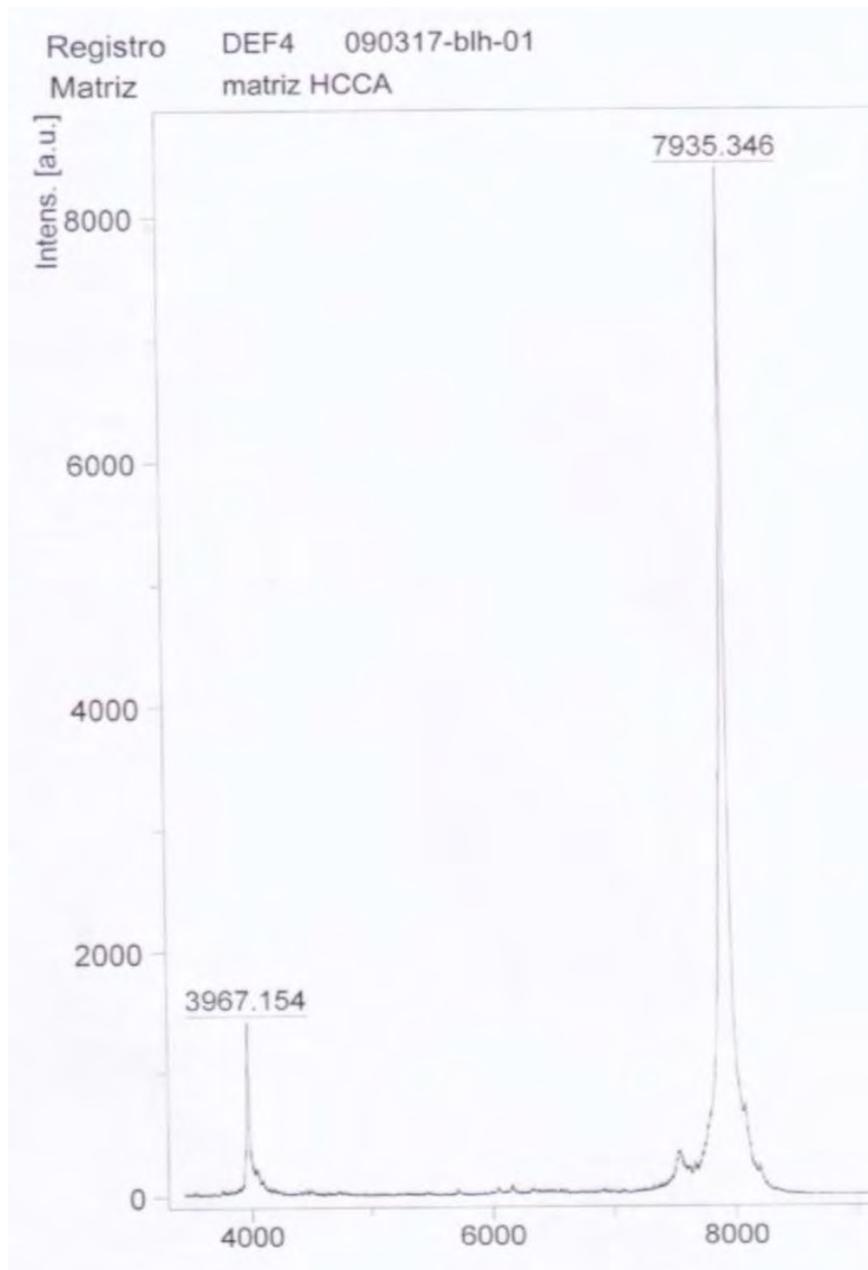


Figura 7.1. Espectro de masas de la DEF4 doblemente enriquecida en isótopos de  $^{13}\text{C}$  y  $^{15}\text{N}$ . En la figura se observa una señal mayoritaria y la distribución

**APÉNDICE F PROTOCOLO PARA GELES DE ELECTROFORESIS**

**PREPARACIÓN DE LOS GELES Y MUESTRAS**

Mezclar los siguientes compuestos para el gel separador y el gel concentrador acordes al porcentaje deseado, según la siguiente tabla.

Gel de Acrilamida									
Sustancia	Gel concentrador al		4.0%	Gel separador al...					
	Cantidad			Cantidad	13.0%	Cantidad	14.0%	Cantidad	15.0%
H <sub>2</sub> O	3150	μL		4150	μL	3900	μL	3650	μL
Disolución amortiguadora	pH: 6.8	1250	μL	pH: 8.8	2500	μL	pH: 8.8	2500	μL
SDS al 20%	66	μL		100	μL	100	μL	100	μL
Acrilamida 40%	500	μL		3250	μL	3500	μL	3750	μL
TEMED	4	μL		6	μL	6	μL	6	μL
APS 10%	20	μL		30	μL	30	μL	30	μL
Volumen Total	5.0	mL		10.0	mL	10.0	mL	10.0	mL

El **APS** (persulfato de amonio) debe **agregarse al final** justo antes de colocar la disolución en los moldes donde se hará el gel, puesto que este reactivo inicia la reacción de polimerización. Puesta la disolución del gel separador en los moldes, se le agregan alrededor de 100 - 150 μL de isopropanol para hacer la superficie superior del gel lo mas plana posible. Gelificada la parte separadora (15 – 30 min.), se retira el isopropanol y agrega la mezcla para el gel concentrador con APS. Se colocan los peines apropiados para fabricar los carriles y se deja gelificando.

Las muestras preparadas se cargan en los carriles del gel (10 – 15 μL). Generalmente en el primer carril se carga una alícuota de marcadores de pesos moleculares.

**PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS**

Una alícuota de 30 μL del lisado celular (sobrenadante) se le añaden 30 μL de disolución amortiguadora de carga (**1X**), se mezcla, se calienta con agua en ebullición durante 5 minutos y se centrifuga para homogenizar la mezcla. Inmediatamente se cargan las muestras en el gel.

APÉNDICE G DISOLUCIONES AMORTIGUADORAS PARA LA DEF4

<b>Componente</b>	<b>Disolución amortiguadora</b>		
	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>
Fosfatos	50 mM		
NaCl	300 mM		
Imidazol	10 mM	20 mM	250 mM
pH	8.0		

<b>Componente</b>	<b>Disolución amortiguadora</b>		
	<b>E</b>	<b>F</b>	<b>G</b>
Fosfatos	100 mM		
Tris	10 mM		
Urea	8 M		
pH	8.0	6.3	4.5

**Disolución amortiguadora para  
la reducción de puentes  
disulfuro**

100 mM DTT

**Disolución amortiguadora E**

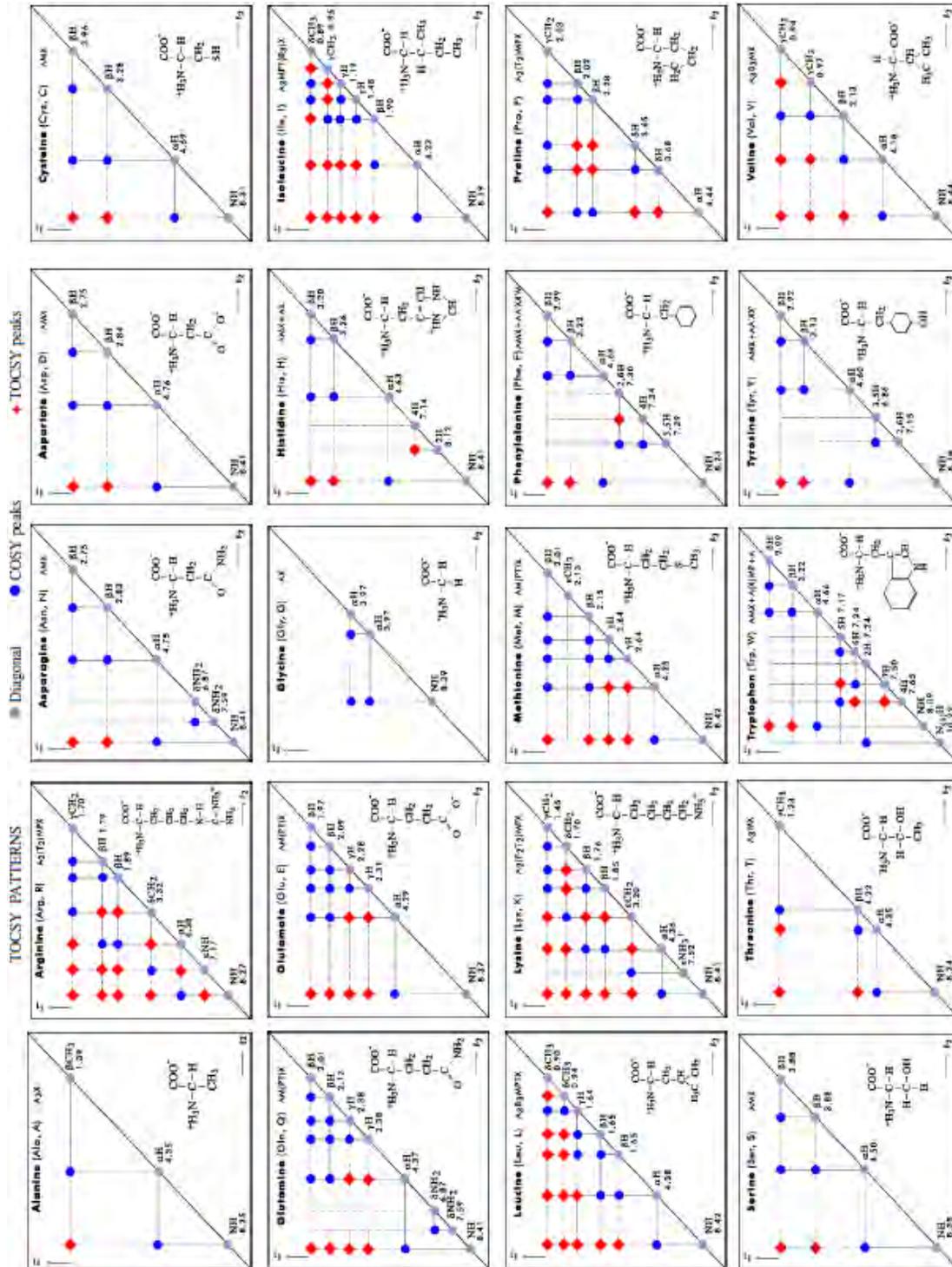
Fosfatos	100 mM
Tris	10 mM
pH	8.0

**Disolución amortiguadora para el  
plegamiento**

Tris	100 mM
Arginina	600 mM
pH	8.0
Cistina	0.5 mM
Cisteína	5.0 mM

APÉNDICE H

SISTEMAS DE ESPÍN LOS 20  $\alpha$ -AMINOÁCIDOS<sup>‡</sup>



<sup>‡</sup> Los 20  $\alpha$ -aminoácido más comunes en la naturaleza