



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**“PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE QUIMERAS DE LA
LIPASA DE *Bacillus pumilus* UNIDAS A PÉPTIDOS
HETERODIMERIZANTES”.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

PRESENTA:

Angélica Mariel Torres Morales

TUTOR

Dr. Ismael Bustos Jaimes

México, Cd. De México, 2016





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.

Este trabajo contó con recursos del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT, Proyecto IN200316), y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) (Proyecto CB-2010-01-151189).

AGRADECIMIENTOS

A todas las personas que me ofrecieron comprensión y ayuda incondicional, mostrando su interés y apoyo para mi preparación profesional:

A mi tutor: Ismael Bustos, quien procuró tener tiempo e interés por saber los avances que iba teniendo, corrigiendo, sugiriendo, y alentando mi trabajo en el laboratorio.

A Hugo Santillán y Arturo Soto, ya que gracias a ellos y a su paciencia, logré aprender la gran mayoría de las técnicas que fueron necesarias para la realización de este proyecto.

A mi hermana Monserrat Torres, quien ha estado conmigo, escuchando todas mis inquietudes ya sean académicas o existenciales, apoyando y ayudándome de todas las formas que estaban en sus manos, y que de igual forma ha dedicado su tiempo e interés en cada etapa de mi vida, sin importar la hora o la fecha. Siendo la persona que me ha hecho más llevadera la vida, dándome incontables días de felicidad llenos de amor.

A mi hermano Marco Torres y a mi papá Marco Torres, quienes han sido un gran apoyo moral y emocional en toda mi vida, preocupándose por mí en todo momento.

A Daniel Sepúlveda, quien ha estado conmigo durante toda mi vida universitaria, apoyándome y haciendo mi vida académica más interesante, llenándola de retos y metas para obtener nuevos y más diversos conocimientos. Quien me ha demostrado que está conmigo en las buenas y en las malas, haciendo mi vida menos difícil, dándome incontables días de felicidad llenos de amor.

A mi tía Marcela Morales, quien ha estado conmigo a lo largo de toda mi formación profesional, apoyando mis decisiones y alentando mis sueños y metas. Quien se ha preocupado por mí y por mis hermanos en todo momento, ayudándonos en lo que le fuera posible, sin esperar nada a cambio.

A mi familia Morales Mejía, y a la familia Sepúlveda Cuéllar, quienes han estado al pendiente de mis avances, apoyando y ayudando de distintas formas.

A Bryan Martínez, quien ha sido un gran apoyo a lo largo de mi carrera y en el proceso de la realización de mi tesis, orientándome y escuchando mis dudas, o avances que fui teniendo a lo largo de todo este tiempo.

A mis compañeros del laboratorio, por ayudarme en cualquier momento, ya fuera en dudas teóricas o experimentales en el transcurso de la realización de este proyecto.

A mi jurado de examen: Dra. Georgina Garza-Ramos, Dr. Alejandro Fernández, Dr. Ismael Bustos, M. en C. Jorge Marcos y a la Dra. Laura Kawasaki

Al Dr. Alejandro Fernández, que me dio las bases teóricas para la comprensión de todos los procesos termodinámicos que se observaron en la experimentación, los cuales aportaron información muy valiosa para el análisis de mis resultados.

Y a todos los maestros que me fueron formando a lo largo de la licenciatura, y sobre todo a la Universidad Nacional Autónoma de México.

Hay hombres que luchan un día y son buenos. Hay otros que luchan un año y son mejores. Hay quienes luchan muchos años, y son muy buenos. Pero hay los que luchan toda la vida, esos son los imprescindibles. Bertolt Brecht

Montserrat Torres M.,

Marco Torres M.,

Daniel Sepúlveda C.,

Marcela Morales M.

Índice

I. LISTA DE TABLAS	10
II. LISTA DE FIGURAS	11
III. RESUMEN.....	13
IV. INTRODUCCIÓN.....	14
1. BIOLOGÍA SINTÉTICA.....	15
1.1. ¿Qué es la biología sintética?	15
1.2. Aplicaciones de la biología sintética.	16
1.3. Tectones, unidades de construcción.....	19
2. HÉLICES SUPERENROLLADAS	20
2.1. Estructura.....	21
2.2. Usos y aplicaciones industriales del heterodímero de hélices superenrolladas	22
2.3. Implicaciones biológicas	23
3. LIPASAS	24
3.1. Estructura.....	24
3.2. Mecanismo catalítico	25
3.3. Aplicaciones industriales.....	28
3.4. Lipasa de <i>Bacillus pumilus</i>	29
3.5. Caracterización de la lipasa recombinante de <i>Bacillus pumilus</i>	31
4. LIPASA UNIDA A UN DOMINIO DE HÉLICE SUPERENROLLADA	35
V. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	37
VI. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	38
1. HIPÓTESIS.....	38
2. OBJETIVO PRINCIPAL	38
3. OBJETIVOS PARTICULARES	38
VII. MATERIAL Y MÉTODOS.....	39
1. TABLAS DE MATERIALES.....	39

1.1. Materiales	39
1.2. Composición de amortiguadores y disoluciones	40
1.3. Equipos.....	42
2. MÉTODO	42
2.1. Diseño de las quimeras.....	42
2.2. Transformación bacteriana.	43
2.3. Purificación de plásmidos.	43
2.4. Digestión del plásmido purificado	44
2.5. Prueba de actividad con tributirina.....	44
2.6. Expresión de las quimeras.....	44
2.7. Obtención de extracto celular.	45
2.8. Lavado de cuerpos de inclusión.....	45
2.9. Purificación de las quimeras.	46
2.10. Determinación de la concentración de proteína.....	46
2.11. Estabilidad de las enzimas quiméricas.	47
2.12. Caracterización cinética de las quimeras.	48
2.13. Análisis de la formación de heterodímeros centrifugación isopícnica mediante gradientes continuos de cloruro de cesio (CsCl).....	49
VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	50
1. RESULTADOS.....	50
1.1. Diseño de las quimeras.....	50
1.2. Análisis de los plásmidos pET-EcBpIA y pET-KcBpIA	51
1.3. Prueba de actividad con tributirina.....	52
1.4. Expresión de las proteínas quiméricas.	53
1.5. Purificación de las proteínas quiméricas.....	55
1.6. Determinación de la concentración de proteína.....	56
1.7. Estabilidad de las enzimas quiméricas: determinación de las constantes de inactivación térmica (k_{ie}).	56
1.8. Caracterización cinética de las quimeras.....	59
1.9. Análisis de la formación de heterodímeros centrifugación isopícnica mediante gradientes continuos de cloruro de cesio (CsCl).....	60

IX. CONCLUSIONES	62
X. PERSPECTIVAS	63
XI. BIBLIOGRAFÍA	64
XII. APÉNDICE 1	69
1. SECUENCIAS COMPLETAS VS SECUENCIA OPTIMIZADA.	69
2. VECTOR DE EXPRESIÓN PET22B(+).	70
XIII. APÉNDICE 2	71

I. Lista de tablas

TABLA 1. APLICACIONES INDUSTRIALES DE LAS LIPASAS.	29
TABLA 2. PARÁMETROS CINÉTICOS Y TERMOESTABILIDAD DE LAS LIPASAS BPLA Y BPLA-G28S.....	32
TABLA 3. REACTIVOS QUÍMICOS.	39
TABLA 4. REACTIVOS PARA LLEVAR ACABO LA DIGESTIÓN DE PLÁSMIDOS.	40
TABLA 5. AMORTIGUADORES PARA EL LAVADO DE CUERPOS DE INCLUSIÓN: KCBPLA.....	40
TABLA 6. AMORTIGUADORES PARA LA PURIFICACIÓN DE LA QUIMERA KCBPLA	40
TABLA 7. AMORTIGUADORES PARA LA PURIFICACIÓN DE LA QUIMERA ECBPLA	41
TABLA 8. EQUIPOS.....	42
TABLA 9. SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE LAS QUIMERAS ECBPLA Y KCBPLA.	50
TABLA 10. CONCENTRACIÓN DE LAS QUIMERAS KCBPLA Y ECBPLA POR BCA.	56
TABLA 11 CONSTANTES CINÉTICAS A 25°C	60
TABLA 12. PREPARACIÓN DE MEDIO LURIA BERTANI (LB).....	71
TABLA 13. PREPARACIÓN DE GEL SDS-PAGE.....	71
TABLA 14. MEZCLA DESNATURALIZANTE:	72
TABLA 15. PREPARACIÓN DEL REACTIVO BCA PH11.3:	72

II. Lista de figuras

FIGURA 1. INTERRUPTOR DE DOS POSICIONES (LATCH RS).....	18
FIGURA 2. UNA VISIÓN GENERAL DEL USO DEL MOTIVO PEPTÍDICO DE HÉLICES SUPERENROLLADAS (COILED-COIL) DE AUTO-ENSAMBLAJE PRESCRIPTIVA.....	20
FIGURA 3. PATRÓN CARACTERÍSTICO DE LAS INTERACCIONES DE HÉLICE SUPERENROLLADA.	21
FIGURA 4. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE UNA HÉLICE SUPERENROLLADA DIMÉRICA PARALELA Y MODELADO DE LA ESTRUCTURA DEL ZIPPER LEUCINA DE GCN4.....	22
FIGURA 5. REACCIÓN DE HIDROLISIS CATALIZADA POR LAS LIPASAS EN PRESENCIA DE AGUA	24
FIGURA 6. PATRÓN DE PLEGAMIENTO DE LAS LIPASAS	25
FIGURA 7. MECANISMO DE LA REACCIÓN DE LAS LIPASAS	27
FIGURA 8. ALCOHÓLISIS Y TRANSESTERIFICACIÓN CON LIPASAS.....	28
FIGURA 9. MODELO ESTRUCTURAL DE BPIA.....	31
FIGURA 10. ILUSTRACIÓN ESQUEMÁTICA DE LA CONSTRUCCIÓN ENZIMA-DOMINIO DE HÉLICE SUPERENROLLADA.....	36
FIGURA 11. REPRESENTACIÓN DE LA SECCIÓN TRANSVERSAL DE LA HÉLICE SUPERENROLLADA E/K.	51
FIGURA 12. ANÁLISIS DE PLÁSMIDOS POR ELECTROFORESIS	52
FIGURA 13. PRUEBA DE ACTIVIDAD LIPOLÍTICA EN AGAR LB CON TRIBUTIRINA AL 0.5% E IPTG 0.25 mM..	53
FIGURA 14. SDS-PAGE (EXPRESIÓN VS. SIN EXPRESIÓN)	54
FIGURA 15. PROTEÍNA KCBPLA.....	55

Lista de figuras

FIGURA 16. PURIFICACIÓN ECBPLA Y KCBPLA. A) PURIFICACIÓN ECBPLA.....	56
FIGURA 17. REACCIÓN DE HIDRÓLISIS DE 4NFA CATALIZADA POR LIPASAS	57
FIGURA 18. GRÁFICO DEL LN (A_{CTT}/A_{CT0}) EN FUNCIÓN DEL TIEMPO.....	58
FIGURA 19. CURVAS DE PROGRESO DE REACCIÓN NORMALIZADAS PARA DIFERENTES CONCENTRACIONES DE SUSTRATO (4NFA).....	60
FIGURA 20. GRADIENTES DE CsCL.	61

III. Resumen

El advenimiento de la biología sintética ha permitido abordar distintos problemas tecnológicos desde una nueva perspectiva. Ahora es posible generar nuevas moléculas y materiales biológicos que permitirán desarrollar formas alternativas y más eficientes de síntesis y producción de bienes de consumo como biocombustibles, biofármacos y nanobioestructuras.

Algunos elementos nanoestructurales de la biología sintética constan únicamente de fragmentos de proteína, péptidos, capaces de realizar tareas de reconocimiento y unión; este es el caso de los péptidos heterodimerizantes E-coil y K-coil, los cuales son capaces de formar una estructura de hélices superenrolladas (coiled-coils) con una gran afinidad. La incorporación de uno de estos péptidos en la superficie de una proteína o complejo proteico permitiría la interacción de esta proteína con otras estructuras que igualmente presenten el péptido complementario en su superficie. Sin embargo, el despliegue de estos péptidos puede tener consecuencias en la estabilidad y propiedades fisicoquímicas de las proteínas a las que se encuentran unidos. En este trabajo estudiamos el efecto de la presencia de los péptidos E-coil y K-coil en la superficie de la lipasa de *Bacillus pumilus* (BpIA). Las lipasas se han utilizado como catalizadores en diversas industrias, tanto para la hidrólisis y síntesis de ésteres en forma regio- y enantioselectiva. En este trabajo se diseñaron los genes para expresar quimeras de la BpIA fusionada en el extremo amino terminal a los péptidos E-coil y K-coil, y se incluyó una etiqueta de His en el extremo C-terminal para facilitar su purificación. Las proteínas fueron expresadas y su caracterización bioquímica indica que la presencia de los péptidos heterodimerizantes, aunque altera la actividad catalítica de la lipasa, no la impide por completo, por lo que podría utilizarse como punto de partida para la generación de supraestructuras proteicas con actividad lipolítica.

IV. Introducción

Los péptidos heterodimerizantes E-coil y K-coil, son péptidos con estructura helicoidal capaces de interactuar el uno con el otro a través de la formación de una estructura de hélices superenrolladas (coiled-coils) con una alta afinidad (De Crescenzo et al., 2003). Hipotéticamente, la presentación de estos elementos en la superficie de cualquier molécula o ensamble molecular obligaría a que estas moléculas permanezcan unidas por medio de su interacción. Esto, a su vez, permitiría el desarrollo de sistemas supramoleculares.

Durante las últimas décadas, las lipasas se han utilizado como catalizadores para la síntesis de ésteres de interés industrial, como fármacos quirales, pesticidas, surfactantes, y otras moléculas con actividad biológica. La aplicación de estas enzimas depende fuertemente de su estabilidad operacional. En este sentido, se han desarrollado sistemas de inmovilización que han aumentado significativamente la vida media de estas enzimas y han permitido su reutilización. Sin embargo, su aplicación requiere una innovación constante que permita la aplicación de estas enzimas en medios tan variados como los que las necesidades químicas nos puedan demandar. Por esta razón, los estudios de nuevas lipasas y de nuevos sistemas de inmovilización siguen en constante desarrollo. Un ejemplo de nuevos métodos de inmovilización son los nanoacarreadores de naturaleza viral (Cardinale et al., 2012). En estos, las enzimas de interés son desplegadas en la superficie o el interior de los virus o partículas tipo virus (virus sin material genético).

En este proyecto propusimos el diseño, expresión, purificación y caracterización de dos quimeras de la lipasa de *Bacillus pumilus* (BplA) (Bustos et al., 2010). Estas quimeras son resultado de la fusión del material genético que codifica para un péptido heterodimerizante (E- o K-coil) y la propia enzima BplA. El objetivo de este proyecto es estudiar el efecto de la adición de los fragmentos heterodimerizantes sobre la actividad catalítica de la BplA. Estas lipasas quiméricas, en principio, podrían adherirse o inmovilizarse mediante su unión a otras moléculas o superficies que presenten los péptidos heterodimerizantes complementarios. Esta propiedad podría aprovecharse con fines biotecnológicos.

1. Biología sintética

La designación de “biología sintética” surge en 1912 (fecha en la que Stephan Leduc publica en París su *Biologie synthétique*), como título de un libro que, teniendo en cuenta su fecha de publicación, aunque hoy en día su concepto difiere del concepto contemporáneo ya que ha ido cambiando con el tiempo. No fue hasta la última década del siglo XX, que las cuestiones científicas de la biología sintética pasaron a tener validez. En este momento los científicos comenzaron a intentar el diseño y la síntesis de circuitos genéticos (Camps *et al*, 2011) no encontré esta referencia. Posteriormente, con los descubrimientos realizados en la investigación genómica y en la ingeniería genética, particularmente la tecnología del ADN recombinante, se tuvo acceso a un conjunto de métodos y un inventario de partes biomoleculares que fueron clave para afrontar la construcción y ensamblaje de sistemas biológicos artificiales (Díaz, 2013).

1.1. ¿Qué es la biología sintética?

El término biología sintética describe, en términos generales, las líneas de investigación, en el ámbito de las ciencias de la vida interesadas en la síntesis de partes de sistemas biológicos o en la construcción de modelos de sistemas biológicos diferentes de los que existen en la naturaleza. Esta técnica abarca diferentes enfoques: bioingeniería, genómica sintética, protocélulas y la biología molecular artificial (no natural) (Camps *et al*, 2011). Se trata de una nueva área de la biología y la tecnología, que fusiona la biología molecular, la ingeniería genética y las herramientas computacionales para crear sistemas biológicos con funciones novedosas. Además de la biología molecular, la biología sintética requiere de las diferentes técnicas de ensamblaje sistemático y estandarizado de distintas secuencias de ADN, para generar información genética nueva (Aguilar *et al.*, 2012). La biología sintética ofrece un potencial desarrollo para el ser humano en sectores productivos muy variados, especialmente en el ámbito de la salud (Camps *et al*, 2011).

La biología sintética nació con el objetivo general de la ingeniería biológica para el control celular (Khalil & Collins, 2010), su objetivo es diseñar y obtener, mediante ingeniería, productos con base biológica, instrumentos y sistemas nuevos, así como rediseñar sistemas biológicos naturales ya existentes (Camps *et al.*, 2011). Con este nuevo enfoque científico, se están abordando distintos problemas tecnológicos, como nuevas formas de síntesis y producción de biocombustibles, biofármacos y nanoestructuras (Aguilar *et al.*, 2012).

1.2. Aplicaciones de la biología sintética.

La salud humana se ve afectada por diferentes factores, como la emergente resistencia a los antibióticos, el cáncer y la obesidad. Mientras que la medicina se enfrenta a estos desafíos con dificultades, la biología sintética ha hecho avances prometedores en un período de tiempo relativamente corto. De hecho, la construcción racional y guiada de partes biológicas está permitiendo el desarrollo de nuevos métodos de investigación y nuevas plataformas terapéuticas, desde la identificación de los mecanismos de la enfermedad, hasta la producción y entrega de moléculas pequeñas con actividad farmacológica (Khalil & Collins, 2010).

En poco tiempo, la biología sintética ha hecho avances prometedores en sus aplicaciones para uso terapéutico. Entre estas se incluyen el descubrimiento de nuevos fármacos y las mejoras en su producción, así como formas nuevas de tratamiento y administración de medicamentos (Díaz, 2013). Las aplicaciones prácticas de la biología sintética se pueden ver en biosensores, producción de biocombustibles, productos farmacéuticos y nuevos biomateriales. Su aplicación multivalente hace que los productos de la biología sintética sean potentes y prometedores (Khalil & Collins, 2010).

Algunas aplicaciones de la biología sintética son: 1) Estudio del mecanismo de la enfermedad. Proporciona un marco para reconstruir sintéticamente los sistemas biológicos naturales para explorar la forma patológica. 2) Identificación del blanco del fármaco. La construcción de rutas sintéticas y sistemas a partir de piezas

individuales es una forma de identificar mecanismos de la enfermedad y objetivos blancos terapéuticos. Otra es la de implementar dispositivos de biología sintética para sondear sistemáticamente la función de los componentes individuales de una vía natural. 3) Descubrimiento de medicamentos. Ensayos de cribado de células enteras pueden ser diseñados utilizando estrategias de biología sintética para el descubrimiento de fármacos. 4) El tratamiento terapéutico. Se han desarrollado dispositivos de biología sintética para servir como terapias, pueden ser programados para dirigirse a los agentes patógenos específicos y a los mecanismos patológicos. 5) Suministro terapéutico. Se pueden usar circuitos sintéticos y las vías para el suministro controlado de fármacos, así como para la terapia génica y metabólica. En algunos casos, el sofisticado control cinético sobre la liberación del fármaco en el cuerpo puede producir ventajas y reducir los efectos secundarios no deseados. 6) La construcción de rutas biosintéticas. Por lo general, se realiza una búsqueda de microorganismos que tienen la capacidad innata de lograr algún tipo de actividad biosintética, por otra parte, se puede realizar la importación de los genes biosintéticos en un huésped microbiano industrial. 7) Programación novedosa, funcionalidad y materiales. Más allá de facilitar las tareas metabólicas, los sistemas sintéticos pueden dar nueva funcionalidad en los organismos manipulados con fines de producción o para la construcción de nuevos materiales (Khalil & Collins, 2010).

La biología sintética se ha utilizado en el tratamiento de enfermedades congénitas como la agammaglobulinemia, una inmunodeficiencia primaria. Mediante la reconstrucción sintética del sistema de señalización del receptor de antígenos BCR (B cell receptors) es el receptor de linfocitos B humano, pudo asociarse esta enfermedad a un defecto en el gen que codifica la Ig- β , que a su vez provoca un fallo en el ensamblaje del receptor en la membrana. También se han reconstruido genomas virales patogénicos como el causante del síndrome respiratorio agudo y grave (SARS), facilitando la identificación de mutaciones responsables del cambio de tropismo a humanos o de una mayor virulencia (Khalil & Collins, 2010).

Introducción

Desde el punto de vista terapéutico, la biología sintética es capaz de proporcionar un marco para reconstruir sistemas biológicos naturales y explorar de qué forma surgen los comportamientos patológicos en esos sistemas. En otras palabras, puede construir un "campo de pruebas" sintético en el que es posible estudiar un sistema natural más complejo. Esto nos daría acceso a las causas patológicas que hacen que el sistema funcione mal y permite identificar blancos terapéuticos para contrarrestarlas. Una vez identificado el componente defectuoso de un sistema biológico, la biología sintética puede utilizarse para diseñar ensayos de rastreo para descubrir fármacos que traten el defecto. La posibilidad de montar estos sistemas en células completas permite aproximarse a las condiciones reales de utilización del fármaco y mejorar la selección de candidatos (Díaz, 2013).

Los circuitos y vías de la biología sintética pueden ser utilizados para la liberación controlada de medicamentos. Esto es de especial importancia en aquellos casos en los que se necesita un control muy preciso de la liberación del compuesto para conseguir una ventaja terapéutica o reducir un efecto secundario adverso. Por ejemplo, la mayoría de las hormonas son liberadas en pulsos de tiempos concretos. El poder mimetizar estos patrones de liberación a la hora de suministrar hormonas sintéticas puede reducir sus efectos secundarios y mejorar la respuesta terapéutica. Esta síntesis y liberación periódicas pueden conseguirse con el uso de osciladores sintéticos o circuitos programados de retardo. También puede programarse el sistema para que se autodestruya (Figura 1) después de un número definido de ciclos celulares. Los circuitos de la biología sintética también ofrecen una posibilidad de mayor control para la terapia génica, como la habilidad de silenciar, activar o regular la expresión de genes de forma dinámica (Díaz, 2013).

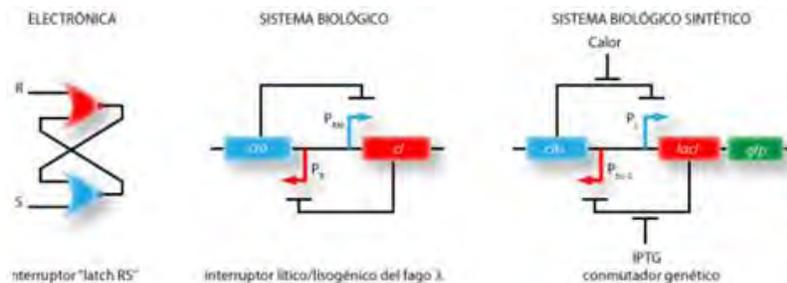


Figura 1. Interruptor de dos posiciones (latch RS). En la figura mostramos un elemento electrónico común, el interruptor latch RS, que permite almacenar información alternando entre estados R (reset)

y S (set). Este tipo de circuito tiene equivalentes naturales como el sistema lítico/lisogénico del fago λ , que permite alternar ciclos de lisis o lisogenia mediante la represión recíproca de promotores por parte de los factores. La biología sintética imita a las construcciones de circuitos electrónicos, utilizando partes de sistemas biológicos naturales para construir circuitos biológicos sintéticos. Estos circuitos sintéticos permiten controlar la respuesta celular de forma muy precisa (Díaz, 2013)

1.3. Tectones, unidades de construcción

Una característica muy atractiva para el uso de péptidos y proteínas, es en lo que podría denominarse "la química biosupramolecular" que es la capacidad de auto-ensamblarse a través de interacciones no covalentes. Un objetivo del diseño e ingeniería de péptidos es explotar esto para crear nuevos montajes supramoleculares (de abajo hacia arriba) de elementos simples a estructuras complejas. Uno de los enfoques consiste en emplear péptidos simples y bloques de construcción de proteínas a los que se les denomina "tectones" para plegarse y auto-asociarse en formas predeterminadas (Figura 2). Este diseño *de novo*, contrasta con los enfoques del montaje de arriba hacia abajo, que se ocupan de la ingeniería de proteínas y la modificación de los diseños o sistemas ya existentes, y las proteínas naturales, incluso sistemas ya ensamblados. El enfoque de abajo hacia arriba tiene la ventaja potencial de permitir un diseño completo y el control de plegado, montaje, tamaño y forma de los objetivos. De este modo, se abre una amplia gama de espacio de construcción y pone a prueba nuestra comprensión de la función del péptido, el plegamiento de proteínas y las interacciones entre péptidos. Sin embargo, en la actualidad, tiene claras desventajas respecto a los sistemas naturales. ya que no comprende totalmente el plegamiento de proteínas de soporte, y, por lo tanto, el diseño racional de la estructura y función de proteínas se encuentra en su infancia (Boyle & Woolfson, 2012). El auto-ensamble es muy complejo, no obstante, puede producir materiales altamente funcionales. Inspirado en los procesos de auto-ensamble que hay en la naturaleza, se está aprendiendo a controlar el equilibrio ciertas interacciones débiles que aumentar la complejidad y la funcionalidad de los nanomateriales auto-ensamblados (Marsden, 2009).

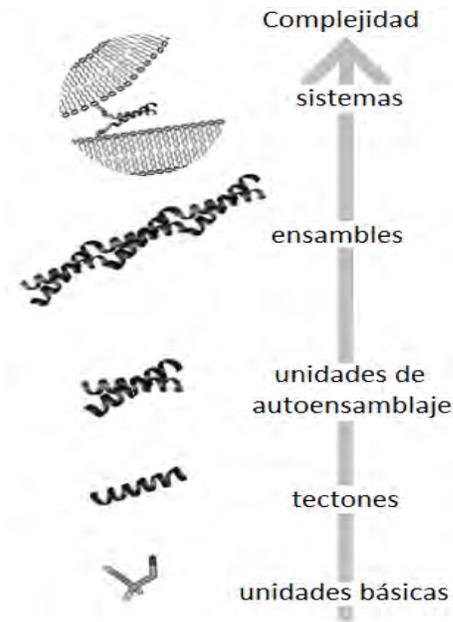


Figura 2. Una perspectiva general del uso del motivo peptídico de hélices superenrolladas (coiled-coil) de auto-ensamblaje. En biología sintética hay una gama de unidades de base naturales y sintéticos, y para cada uno hay una progresión de las unidades básicas, a tectones, a las unidades de auto-ensambladas, a las ensambladas. Como objetivo final múltiples conjuntos se combinan para producir sistemas funcionales (Marsden, 2009).

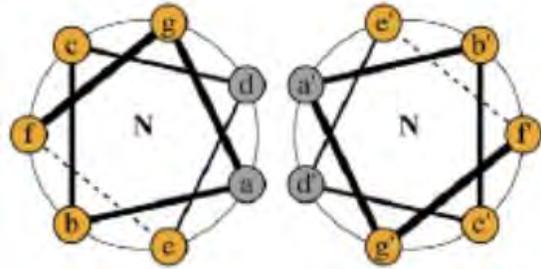
La biología sintética incluye, a su vez, a la bionanotecnología; una división de la nanotecnología que se enfoca en la investigación y en el desarrollo de nuevos materiales a escala nanométrica, basados en biomoléculas tales como ácidos nucleicos, proteínas y carbohidratos. Dentro de estos materiales naturales se encuentran las partículas pseudovirales o VLPs (virus-like particles) (Manchester & Steinmetz, 2009), y las lipasas, que en las últimas dos décadas, se han convertido en los catalizadores cuyo estudio e interés industrial se ha incrementado (Santillán, 2012).

2. Hélices superenrolladas

La estructura “coiled coil” o de hélice superenrollada es un motivo estructural común, encontró en aproximadamente 3-5% de todos los aminoácidos en las proteínas. Por lo general, se compone de dos a cinco hélices α envueltas alrededor una de la otra en una hélice enrollada hacia la izquierda para formar un superenrollamiento. Mientras que cada hélice α regular tiene 3.6 residuos por cada vuelta completa de la hélice, la distorsión impuesta a cada hélice enrollada hacia la izquierda dentro de una hélice superenrollada reduce este valor a alrededor de 3.5 residuos por vuelta. Por lo tanto 7 residuos de aminoácido son suficientes para completar 2 vueltas de hélice superenrollada (Figura 3). La primera hélice superenrollada fue descrita por Crick en 1953, y el mismo año Pauling y Corey

presentaron un modelo de α -queratina. La secuencia de tropomiosina del esqueleto de conejo, otro ejemplo de hélice superenrollada, fue publicada 20 años después (Mason & Arndt, 2004).

Figura 3. Patrón característico de las interacciones de hélice superenrollada. Los giros de los heptámeros de una hélice superenrollada, donde a y d son aminoácidos hidrofóbicos y el resto son residuos polares o cargados (Huerta, 2011).



2.1. Estructura

Las hélices superenrolladas forman dominios estructurales en diferentes proteínas y median la oligomerización de monómeros, vía asociación de dos o más hélices α enrolladas a la izquierda (Rose et al., 2007). Las secuencias capaces de formar estructuras tipo hélice superenrollada están caracterizadas por tener 2 o más péptidos repetidos, cada uno compuesto por siete aminoácidos designados como a, b, c, d, e, f, y g, donde la primera (a) y la cuarta posición (d) representan residuos hidrofóbicos y el resto de las posiciones (b,c,e,f y g) representan residuos polares. Los aminoácidos a y b forman un núcleo hidrofóbico generando una interfaz entre hélices, ensamblando un complejo proteico denominado tipo "coiled-coil", estos sitios frecuentemente están ocupados por residuos de isoleucina, leucina o valina (Lupas, 1996). Es decir, el patrón de heptada repetida consiste en la localización de residuos de aminoácidos hidrofóbicos en las posiciones primera y cuarta, y en la localización de residuos de aminoácidos cargados o polares en la quinta y séptima posición, generando una cadena peptídica α -hélice (Figura 4). Los enlaces hidrofóbicos entre las posiciones a y b poseen la fuerza necesaria para lograr la interacción de las hélices e influenciar el estado de oligomerización tipo hélice superenrollada (Harbury et al., 1993). Por otro lado, las interacciones electrostáticas entre los aminoácidos polares e y g dan el balance de fuerzas de atracción y repulsión a través de la interface hidrofóbica, que en gran parte definen la especificidad y contribuye a la estabilidad de las asociaciones helicoidales (Zhou et al., 1994).

Introducción

Las proteínas que presentan hélices superenrolladas pueden ser agrupadas en dos clases generales. 1) Proteínas que contienen dominios de hélices superenrolladas cortos, de 6 o 7 heptapéptidos repetidos llamados dominios “zipper” de leucina, establecidos frecuentemente en el dominio de homo y heterodimerización en factores de transcripción. 2) Proteínas que contienen dominios de hélices superenrolladas largos, constituidos por algunos cientos de aminoácidos que usualmente forman las estructuras terciarias tipo “varilla” (Pérez, 2011).

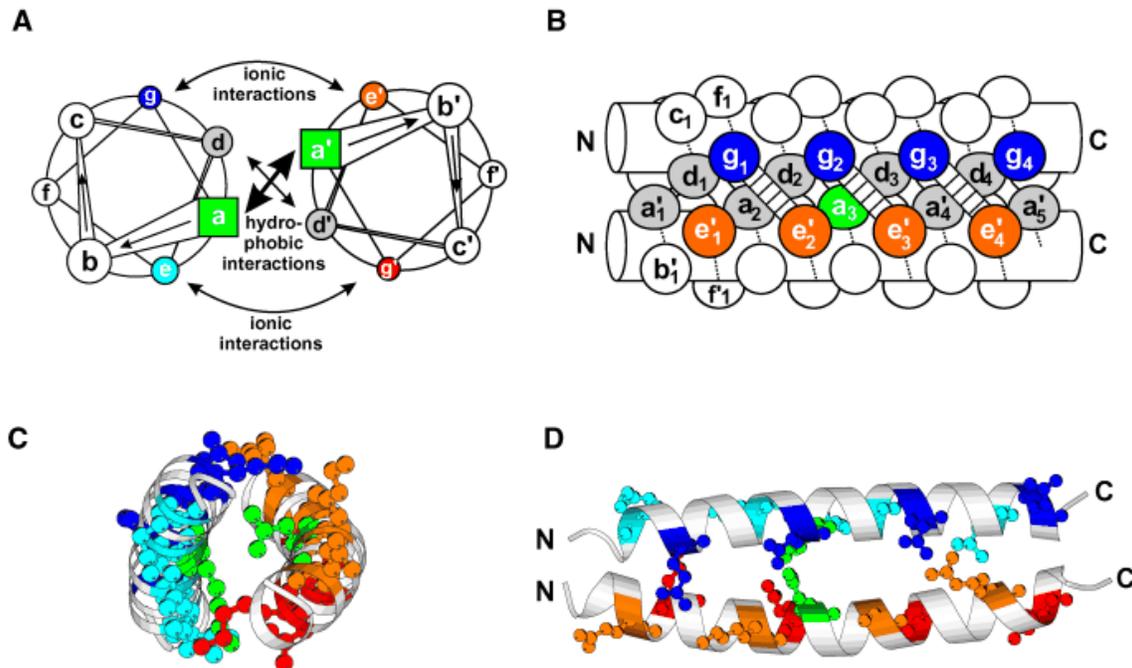


Figura 4. Representación esquemática de una hélice superenrollada dimérica paralela (A y B) y modelado de la estructura del zipper leucina de GCN4 (C y D). Cadenas laterales se muestran como esferas y varillas. El diagrama helicoidal en (A) y el modelado en (C) están hacia abajo del eje de las hélices α de N-terminal a C-terminal. Los paneles (B) y (D) proporcionan una vista lateral. Los residuos son etiquetados de la a-g en una hélice y de a'-g' en la otra. Las interacciones hidrofílicas (g-g' en azul y rojo, respectivamente, e-e' en cian y naranja, respectivamente). Se muestran heptadas. En las representaciones esquemáticas, se muestra el núcleo hidrofóbico (a/a' y d/d')

(Mason & Arndt, 2004)

2.2. Usos y aplicaciones industriales del heterodímero de hélices superenrolladas

La estructura terciaria de las proteínas con hélices superenrolladas está sujeta a multitud de variaciones estructurales, de las cuales dependen sus funciones

biológicas (Ruiz, 2011). Los dominios de hélices superenrolladas proporcionan la capacidad de interactuar con otras proteínas a través de ellos mismos, un proceso que en la mayoría de los casos se produce de manera específica y reversible, controlando así los componentes regulatorios en el tiempo y espacio (Rose & Meier, 2004). Controlando las condiciones ambientales como el pH, la temperatura o la disponibilidad de solutos, y procesos de fosforilación, también es posible modular las características físicas del dominio de hélices superenrolladas. Estos dominios también son ideales para la aplicación de métodos de bioingeniería molecular y nanotecnología, en el diseño y desarrollo de moléculas con una función potencial para la distribución de fármacos y otras moléculas con actividad biológica, función que está íntimamente ligada a la estabilidad estructural y especificidad de los dominios de hélices superenrolladas (Ruiz, 2011).

2.3. Implicaciones biológicas

Las proteínas con dominios de hélices superenrolladas están involucradas en las funciones esenciales de todos los organismos. Pueden formar fibras o se comportan como elementos móviles que funcionan como velcros, cremalleras, adaptadores, espaciadores, y motores basados en proteínas. Tienen un papel determinante en diversas funciones celulares como el transporte celular, la motilidad, la diferenciación y la división celular, la transcripción y la síntesis de proteínas, el plegamiento y la estabilización de proteínas, el transporte y el direccionamiento de proteínas, entre otros (Pérez, 2011). Ejemplo de esto son las proteínas estructurales del citoesqueleto (FIs, lamininas), proteínas motoras (miosina, kinesinas y dineínas); complejos proteicos funcionales que se anclan al aparato de Golgi (las golginas forman un andamiaje para las estructuras de membrana), proteínas del cinetocoro, centrosomas y centrómeros y proteínas involucradas en el reconocimiento molecular (Burkhard et al., 2001; Rose et al., 2007; Rackham et al., 2010).

En este trabajo planteamos incorporar hélices capaces de formar un dominio de hélices superenrolladas en la superficie de una enzima lipólfica. Deseamos

explorar el efecto de la presencia de estos péptidos heterodimerizantes en la estabilidad y actividad de la enzima.

3. Lipasas

Las reacciones lipolíticas se producen en la interface lípido-agua, donde los sustratos lipolíticos pueden formar un equilibrio entre los estados monomérico, y micelar (Sarda & Desnuelle, 1958). Las lipasas (E.C. 3.1.1.3) se definen como carboxilesterasas de acíl-glicerol de cadena larga, cadenas a partir de diez átomos de carbono, que son sustratos para las lipasas, mientras que la hidrólisis preferencial de ésteres de cadenas menores a 10 carbonos usualmente indica la presencia de una esterasa. Sin embargo, la mayoría de las lipasas pueden ser capaces de hidrolizar los sustratos para esterasas, y visceversa (Jaeger et al, 1999) (Figura 5).

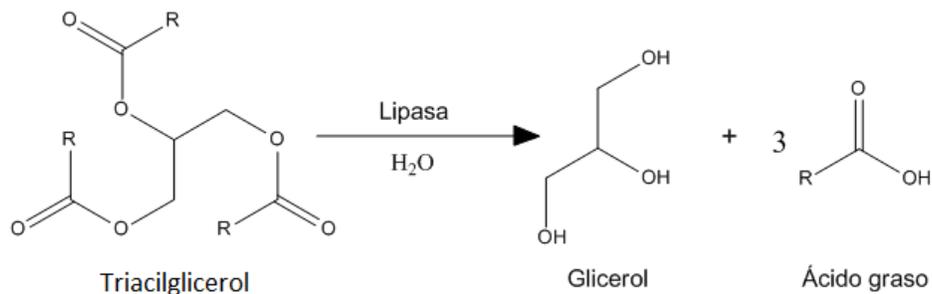


Figura 5. Reacción de hidrólisis catalizada por las lipasas en presencia de agua (Godtfredsen, 1990).

3.1. Estructura

Cuando las primeras estructuras de lipasa se conocieron, se observó que tenían plegamientos muy similares a pesar de la falta de similitud de secuencia (Ollis *et al.*, 1990). Este plegamiento es común a muchas hidrolasas y se denominó plegamiento " α/β hidrolasa" (Cyglér *et al.*, 1992). Este plegamiento contiene una lámina central, de ocho hebras β , donde la segunda hebra es antiparalela, y las secciones $\beta 3$ a $\beta 8$ están conectadas por hélices α que se encuentran unidas a cada lado de la hoja β central (Figura 6).

Estas enzimas muestran claras diferencias en su regioselectividad y enantioselectividad (Rogalska et al, 1993), aún en los casos en que existe un alto porcentaje de identidad de secuencia. El sitio activo de la enzimas α/β hidrolasas consta de tres residuos catalíticos: un residuo nucleofílico (serina, cisteína, o aspartato), un residuo ácido (aspartato o glutamato), y un residuo de histidina, siempre se encuentran en este orden en la secuencia de aminoácidos (Ollis *et al.*, 1990). Otra estructura encontrada en varias lipasas es el dominio que corresponde a la tapa del sitio activo. Generalmente este dominio consiste en una hélice corta de carácter anfipático. La mayoría de lipasas bacterianas presentan un dominio similar que cubre sus sitios catalíticos (Jaeger et al., 1999).

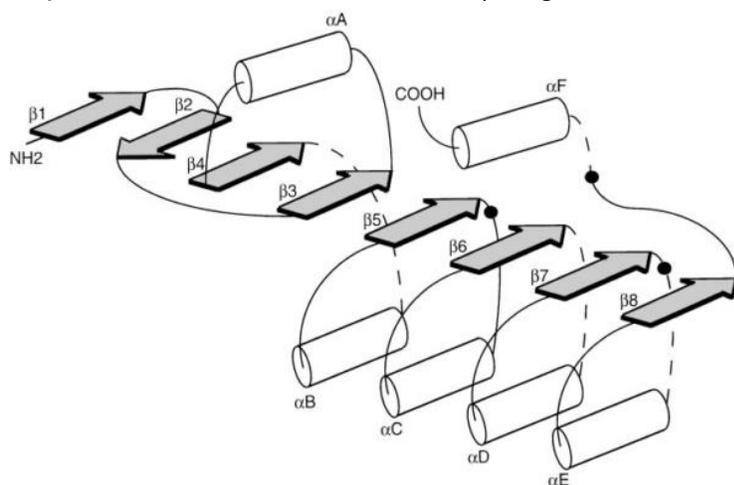


Figura 6. Patrón de plegamiento de las lipasas. Estructura secundaria. Las alfa-hélices se indican mediante cilindros, las lamina beta mediante flechas sombreadas, mientras que la posición de los residuos catalíticos se muestra con círculos sólidos. La línea punteada indica que se trata de asas con longitud variable (Jaeger et al., 1999).

3.2. Mecanismo catalítico

Las enzimas lipolíticas se caracterizan por un aumento de su actividad cuando hay una interfaz lípido-agua (Brzozowski et al., 1991), fenómeno que se denomina activación interfacial. El aumento de la actividad enzimática es desencadenado por reordenamientos estructurales de la región del sitio activo de la lipasa. En ausencia de la interfaz lípido-agua, el sitio activo está cubierto por una "tapa", sin embargo, en presencia de sustancias hidrófobas, la tapa se abre, por lo que los residuos catalíticos se vuelven accesibles al sustrato. La tapa puede constar de una sola hélice (Brzozowski et al., 1991; Derewenda et al, 1992), dos hélices (Schrag et al., 1997), o una asa larga (Grochulski et al, 1994). Sin embargo, no todas las lipasas muestran esta activación interfacial (Jaeger et al., 1999).

Introducción

Las lipasas catalizan reacciones de hidrólisis sobre los enlaces éster presentes en los acilgliceroles. Cuando la hidrólisis del sustrato ocurre por completo en sistemas acuosos, se liberan ácidos grasos y glicerol como productos. Sin embargo, si ocurre en un medio de reacción de carácter orgánico las reacciones favorecidas son las de esterificación, alcoholólisis, aminólisis y tiólisis (Kumar & Gross, 2000). Un ensayo rápido, para identificar la hidrólisis de las bacterias productoras de lipasa, es hacer cajas de medio sólido con triglicéridos emulsificados, como tributirina, trioleína o aceites vegetales. Las emulsiones presentan opalescencia en el medio sólido y cuando un microorganismo productor de lipasa crece en la superficie del agar, se forman halos de hidrólisis alrededor de las colonias (Jaeger et al., 1999)

El mecanismo químico de hidrólisis de lípidos por la acción de las lipasas (Figura 7), comienza con un ataque nucleofílico al carbono del grupo carbonilo que se encuentra formando el enlace éster. En las lipasas cuyo nucleófilo es un residuo de serina, el ataque lo realiza el átomo de oxígeno procedente del grupo hidroxilo de este residuo. En este paso se induce la formación de un intermediario tetraédrico que se caracteriza por poseer una carga negativa en el átomo de oxígeno. Este oxianión es estabilizado mediante puentes de hidrógeno establecidos con un par de grupos NH (amida del enlace peptídico) que se encuentran en un extremo del sitio activo, la llamada “cavidad oxianiónica” (Jaeger *et al.*, 1999). El ataque nucleofílico es favorecido por el residuo de histidina de la triada catalítica, cuyo papel consiste en recibir el protón proveniente del grupo hidroxilo presente en la serina. Este ataque es favorecido por la presencia de un ácido que orienta el anillo del imidazol de la histidina y neutraliza de manera parcial la carga recién generada en él. Posteriormente la histidina cede este protón al oxígeno del enlace éster para formar un alcohol. En este punto el componente ácido del sustrato queda esterificado por la serina nucleofílica (intermediario unido covalentemente), mientras que el alcohol proveniente del éster es liberado. La reacción continúa con un paso de desacilación, en donde una molécula de agua participa hidrolizando al intermediario covalente. La histidina catalítica activa a esta molécula de agua quitándole un protón al oxígeno, el cual ataca nucleofílicamente al carbono carbonílico del intermediario covalente que, a través de un mecanismo idéntico al que usó la serina catalítica

Introducción

para romper el éster, libera al componente acilo que se encontraba unido covalentemente a la serina, formando un ácido carboxílico. Nuevamente, la histidina cede un protón al oxígeno del residuo activo de serina para regenerar su grupo hidroxilo. Después de la difusión del ácido carboxílico producido, la enzima se encuentra disponible para un nuevo ciclo catalítico (Jaeger et al., 1999).

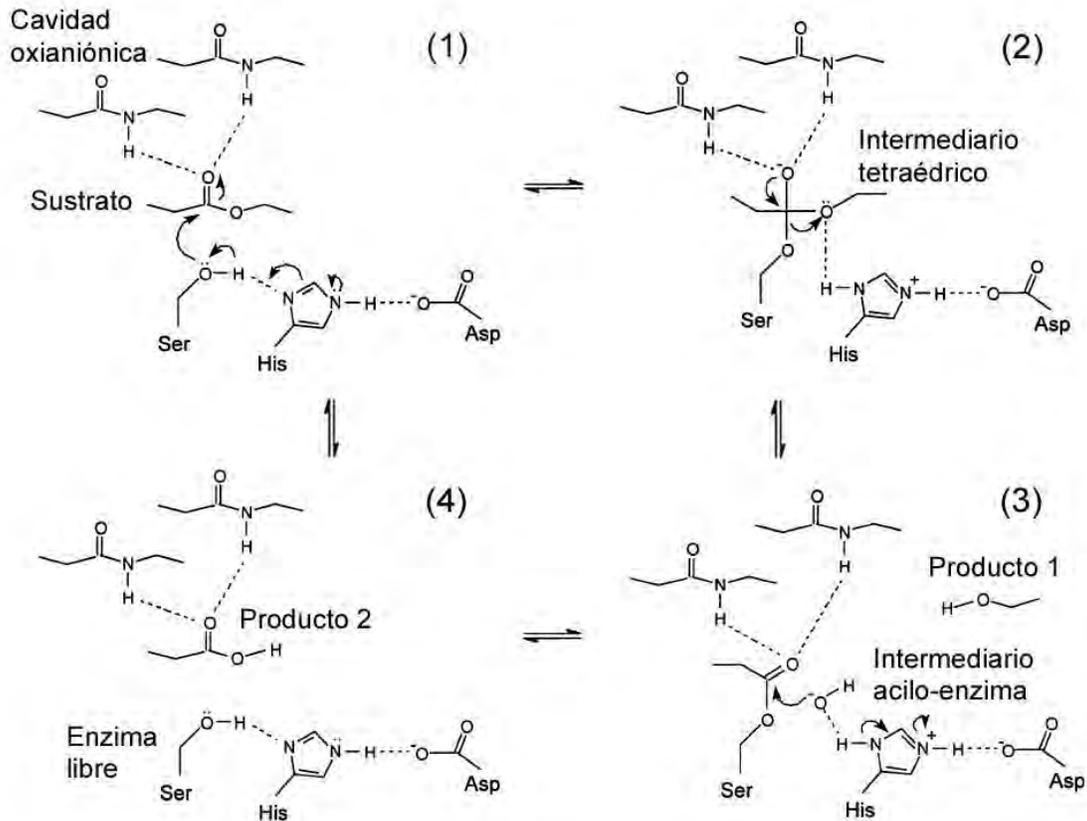


Figura 7. Mecanismo de la reacción de las lipasas. [1] Se activa el residuo nucleófilo de serina y ocurre un ataque nucleofílico al carbono carbonilo del enlace éster. [2] se forma un intermediario tetraédrico, y hay una reorganización electrónica previa a la liberación del motivo alcoholico del éster y formación del intermediario covalente ("acil-enzima"). [3] Entra una molécula de agua, y es activada por el residuo de histidina que se encuentra próximo, el ión hidroxilo resultante ataca al átomo de carbono carbonilo del intermediario covalente, conllevando a la liberación del alcohol, siendo el primer producto. [4] El residuo de histidina dona un protón al átomo de oxígeno del residuo activo de serina, lo que hace que el enlace éster entre la serina y el componente acilo se rompa y libere el segundo producto, el componente acilo, permitiendo así que la enzima se encuentre disponible para un nuevo ciclo catalítico (Jaeger et al., 1999).

En las reacciones de síntesis, las enzimas lipolíticas son útiles en la formación de ésteres a partir de diversos alcoholes, ácidos grasos y otros ésteres de ácidos

grasos. Sin embargo, este tipo de reacciones tiene como factor limitante la eficiencia en la eliminación del agua del medio de reacción. Se pueden distinguir dos tipos de reacción de síntesis: la transesterificación y la interesterificación (Figura 8). La primera implica el Intercambio de ácidos grasos entre triglicéridos, mientras que en el segundo caso se intercambia el grupo ácido de un triglicérido o un éster de ácido graso, por el ácido graso libre (acidólisis) (Berger et al., 1992).

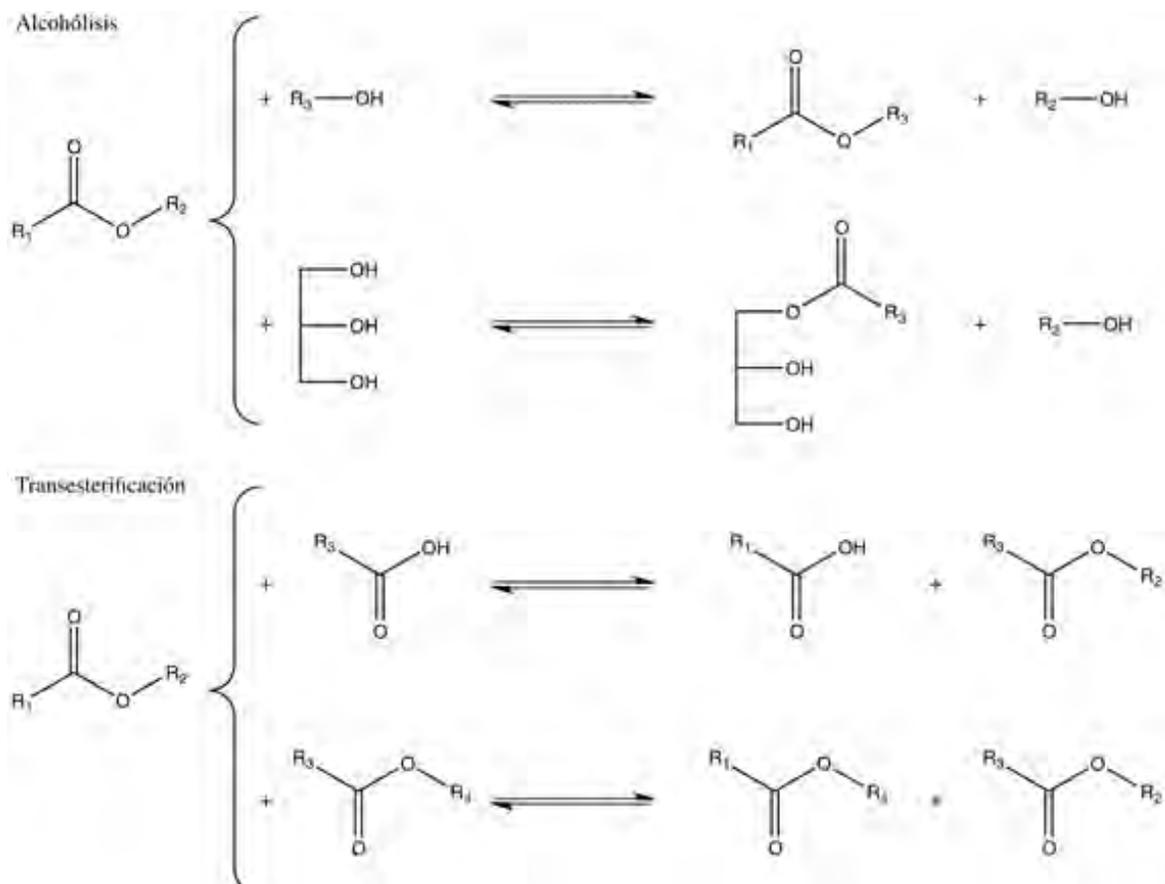


Figura 8. Alcoholólisis y transesterificación con lipasas (Modificado de Ollis et al., 1990).

3.3. Aplicaciones industriales

Las lipasas microbianas tienen aplicaciones industriales debido a su gran diversidad y el amplio espectro de sustratos que pueden utilizar. Existen muchas industrias que se han beneficiado del uso de estas enzimas. Por esta misma razón, la prospección sobre estas enzimas, ya sea por aislamiento de microorganismos o

por evolución dirigida, es continua. En la Tabla 1 se presentan algunos ejemplos de las aplicaciones de estas enzimas en diversas industrias.

Tabla 1. Aplicaciones industriales de las lipasas (Sharma y Kanwar, 2014).

Industria o sector	Aplicación
Alimentos	Producción de sabores, maduración de quesos, modificación de aceites y grasas, remoción de grasas, producción de ésteres emulsificantes o conservadores
Resolución de racematos	Los alcoholes enantiopuros tienen gran valor como sintones para la producción de compuestos químicos de alto valor agregado y pueden ser producidos por hidrólisis con lipasas
Detergentes	Más de la mitad de los detergentes que se consumen en países industrializados contienen lipasas como auxiliares en la solubilización de grasas
Síntesis de ésteres	Diversos ésteres son utilizados en la formulación de alimentos, pesticidas, fármacos y cosméticos. Estos se pueden sintetizar a partir de alcoholes y ácidos orgánicos en medios de actividad acuosa reducida
Textiles	Remoción de lubricantes de la tela y mejoramiento de absorción de colorantes
Síntesis de fármacos y medicina	Para el desarrollo de fármacos, así como lípidos especiales para alimentación
Biosensores	Para medir triglicéridos en muestras biológicas
Cuidado personal	Síntesis de ésteres especiales para emulsificar otros componentes cosméticos. Síntesis de ésteres con aromas agradables para perfumería
Producción de biodiesel	Mediante alcoholisis de triglicéridos de bajo valor comercial o de desecho
Papelería	Remoción de sustancias cerosas y lípidos de la pulpa de papel
Peletería	Eliminación de grasas de las pieles

3.4. Lipasa de *Bacillus pumilus*

Los microorganismos del género *Bacillus* han sido usados para diversos fines debido a que producen enzimas de interés comercial. Las lipasas de este género

no son la excepción. En general, estas enzimas, han sido clasificadas principalmente con base en la homología de secuencia de aminoácidos (Arpigny & Jaeger, 1999). Existen dos grupos de lipasas del género *Bacillus*; las lipasas de alto peso molecular de la subfamilia I.5 y las lipasas de menor peso molecular agrupadas en la subfamilia I.4. La subfamilia I.4 está compuesta exclusivamente por lipasas de miembros del género *Bacillus*. Son enzimas pequeñas, con un peso molecular entre 19-20 kDa. En esta familia se encuentran las lipasas de *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, y *B. circulans*. Todas las enzimas de la subfamilia I.4 presentan una identidad marginal de secuencia (15% aproximadamente) con las lipasas provenientes del género *Bacillus* que forman parte de la subfamilia I.5 y con otras lipasas aún más grandes (Arpigny & Jaeger, 1999).

La lipasa A de *B. subtilis* (BslA) es la más estudiada dentro la subfamilia I.4. Se han hecho estudios muy completos de la estructura del gen, el mecanismo de secreción, la caracterización bioquímica de la proteína y algunas de sus aplicaciones biotecnológicas (Mora, 2008). En nuestro grupo de trabajo se tiene experiencia con la lipasa de *B. pumilus* cepa GMA1. El gen de la lipasa de *B. pumilus* GMA1 revela que esta enzima (BplA) es homóloga a BslA (Bustos *et al.*, 2010). Estas lipasas poseen 181 residuos de aminoácidos y tienen un peso aproximado de 19.5 kDa. Se modeló por homología la estructura de la BplA con base en los datos cristalográficos reportados para la BslA, ya que cuentan con un 80% de identidad entre ambas proteínas (Mora, 2008). El modelo estructural de la BplA muestra una estructura globular con un plegamiento clásico α/β hidrolasa con 6 hebras- β paralelas flanqueadas por 5 hélices α (Figura 9). La triada catalítica corresponde a los residuos de Ser77, Asp133 e His156, en tanto que la cavidad oxianiónica está formada por los grupos amida de los residuos Ile12 y Met78 y estos residuos se están en posiciones muy similares a las encontradas en otras lipasas de estructura conocida. En BplA no se observa la presencia de la tapa, por lo que el sitio activo se encuentra expuesto al disolvente.

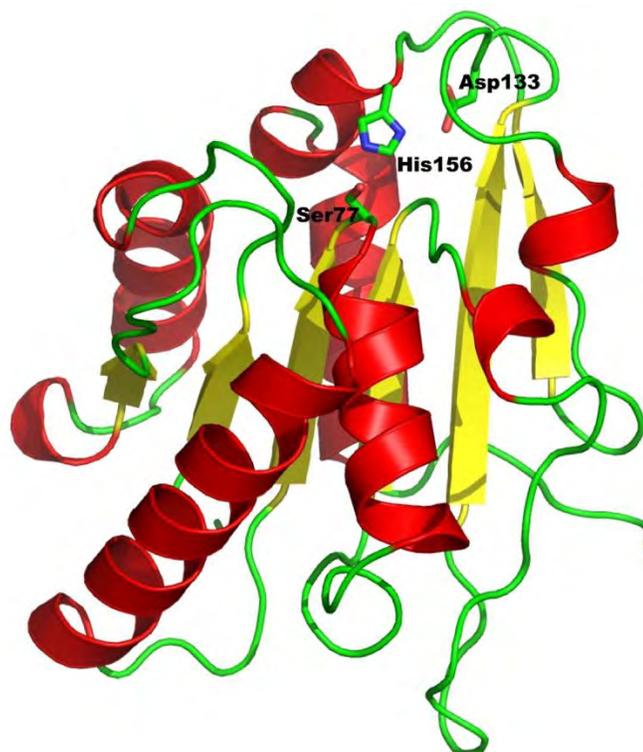


Figura 9. Modelo estructural de BpIA. Se resaltan los residuos catalíticos Ser77, Asp133 e His156 (Mora, 2008).

3.5. Caracterización de la lipasa recombinante de *Bacillus pumilus*

La BpIA ha sido clonada, sobreexpresada en *E. coli* y purificada por cromatografía de afinidad (Mora, 2008; Bustos *et al.*, 2010). La forma recombinante de la enzima está compuesta por los 181 residuos de la forma madura de la misma, más un residuo de Met en el extremo amino terminal. Además, se le adicionó una etiqueta de 6 residuos de His en el extremo C-terminal para facilitar su purificación. Los parámetros cinéticos y la estabilidad térmica de la forma recombinante de la BpIA y algunas mutantes han sido estudiadas. Se encontró que la mutación Gly28Ser tenía un aumento de tres veces la k_{cat} y más del doble la vida media a 20°C con respecto a la enzima parental (Mora, 2008) (Tabla 2). El efecto de esta mutación en las constantes cinéticas mejora la eficiencia catalítica de la enzima con el aumento de temperatura más del doble de lo observado para la enzima no mutada (Bustos *et al.*, 2010).

Tabla 2. Parámetros cinéticos y termoestabilidad de las lipasas BpIA y BpIA-G28S (Mora, 2008).

Enzima	Propiedades catalíticas*			Estabilidad*		
	Temperatura (°C)	K_m (μM)	k_{cat} (min^{-1})	k_{cat}/K_m $\times 10^2$ ($\mu^{-1}\text{min}^{-1}$)	k_{ie} $\times 10^5$ (min^{-1})	$T_{1/2}$ (min)
BpIA	20	726.48	86.28	11.88	0.76	9120.4
	25	400.67	51.10	12.75	61.74	112.3
	30	245.28	44.50	18.14	152.50	45.5
	35	97.56	45.51	46.65	291.40	23.8
	40	108.46	66.28	61.11	898.10	7.7
BpIA-G28S	20	101.18	247.16	24.69	0.30	23104.9
	25	662.27	229.14	34.60	2.44	2840.8
	30	383.41	208.42	54.36	112.20	61.8
	35	250.30	228.13	91.14	169.10	41.0
	40	195.24	259.20	132.76	1198.0	5.8

- * valores obtenidos a pH 7.5 y Tritón X-100 1% v/v.
- k_{ie} , constante cinética de inactivación térmica
- $T_{1/2}$, tiempo de vida media

La actividad de la BpIA frente a distintos sustratos ha sido analizada y se encontró que tiene preferencia por ésteres de ácido butírico cuando el sustrato es un éster de 4-nitrofenol. Lo mismo se observó cuando el sustrato es complejo, como en una emulsión de grasa butírica en la que se encontraban triacilgliceroles de distintos ácidos grasos. En estas condiciones los ésteres de glicerol de ácidos grasos de 14 a 17 átomos de carbono resultaron ser los peores sustratos (Alcántara, 2009).

La BpIA ha sido inmovilizada en diferentes soportes. Por ejemplo, en el material mesoporoso SBA-15 (silicatos con poros organizados de tamaño controlado). La lipasa inmovilizada en este material retuvo más del 46 % de su

actividad tras 14 meses de almacenamiento a 4°C con una actividad acuosa (A_w) de 0.15. Esta enzima fue capaz de sintetizar un éster a partir de 1-feniletanol y ácidos orgánicos en hexano como disolvente, a 37°C por 48 h. Mientras que para el ácido caprónico (C6) se encontró una transformación del 70% del sustrato, para el ácido láurico (C12) solo se obtuvo un 21% de conversión. Estos resultados coinciden con la preferencia de esta enzima por sustratos de cadena corta. Además fue posible hacer una alcoholólisis de vinil estearato con 1-feniletanol, aunque el rendimiento fue de solo 19% (Benítez, 2009). La enzima ha sido inmovilizada en otros materiales, entre ellos sílica gel (SiO_2 poroso), la resina comercial Lewatit y el biopolímero quitosano. En el material a base de SiO_2 se obtuvo una gran retención de proteína pero la actividad de la proteína retenida fue muy baja. En el caso del Lewatit la actividad fue menor que en quitosano y en este último se encontró una mejor retención de proteína y una excelente actividad específica. La inmovilización se hizo por adsorción en los dos primeros casos, mientras que en el quitosano la enzima se entrecruzó con el material utilizando glutaraldehído. Se pudo observar que la enzima inmovilizada sobre quitosano por entrecruzamiento conserva hasta el 30% de la actividad inicial al ser expuesta a 60°C por una hora, mientras que la enzima libre se inactiva por completo en unos minutos. La enzima inmovilizada se mantiene activa después de estar en contacto con disolventes orgánicos como acetonitrilo, acetona, diclorometano, tolueno y hexano por 16 h (Jacobo, 2015).

En la subfamilia I.4 la enantioselectividad ha sido estudiada solo con la BslA y con una lipasa de *B. pumilus* cepa DBRL-191 (Bustos *et al.*, 2009; Rasool *et al.*, 2005). La enantioselectividad hidrolítica y sintética de la BplA recombinante ha sido analizada, en medio acuoso, BplA hidrolizó al racemato (*R,S*)-1-feniletil acetato con un exceso enantiomérico porcentual (%*ee*) de 89, muy similar al mostrado por la BslA en condiciones similares (%*ee* = 92) (Bustos *et al.*, 2009; Santillán, 2012). La BslA inmovilizada en sílica gel, por su parte, es capaz de sintetizar hexanoato de 1-feniletanol, a partir de (*R,S*)-1-feniletanol y ácido hexanoico en hexano como disolvente, con un rendimiento muy bajo de aproximadamente el 20% para el éster *R*, mientras que no se detectó el éster *S*. Esta misma reacción se estudió en dos líquidos iónicos, metanosulfonato de 1-etil-3-metilimidazolio ([Emim][CH_3SO_3]) y

metilsulfato de 1-etil-3-metilimidazolio ([Emim][EtSO₄]). En estos disolventes la BpIA mostró una propiedad interesante, la isoinversión de su enantioselectividad. Esto consiste en que a temperaturas mayores a 25°C la enzima presenta selectividad por el isómero *R* del 1-feniletanol, mientras que al reducir la temperatura a 20°C o menos, la selectividad de la enzima se invirtió prefiriendo ahora al enantiómero *S* del 1-feniletanol. La temperatura a la que se invierte la enantioselectividad se conoce como "temperatura racémica" (García, 2012; Bustos et al., 2010).

El sitio activo de la BpIA también ha sido explorado a través de mutagénesis sitio-dirigida. No se han puesto a prueba los residuos catalíticos ya que no se trataba de confirmar su papel en la catálisis. Entre los residuos que forman parte del sitio activo en las enzimas de la subfamilia I.4 existe una enorme identidad, lo que sugiere algún compromiso estructural con su función. Por esta razón, Herrera (2014) eligió residuos dentro del sitio activo que pudieran tener implicaciones en la enantioselectividad. Esta selección se realizó por inspección visual del modelo estructural de la BpIA y de la estructura cristalográfica de la BslA, además de contar con la ayuda de simulaciones de acoplamiento molecular *in silico* (docking). Se construyeron las mutantes Gly13:Lys, Asn18:Ser, Gly103:Ala, Gly13:Asp y Gly80:Ala para ser analizadas. El estudio de la enantioselectividad de las proteínas mutantes se llevó a cabo con el sustrato (*R,S*)-1-feniletil acetato. Como ya se sabía, BpIA tiene preferencia por el enantiómero *R* del sustrato (Santillán, 2012). En contraste, las mutaciones Gly13:Lys y Asn18:Ser invirtieron la enantioselectividad hacia el enantiómero *S*. Dichas mutaciones además redujeron notablemente la estabilidad de la enzima. Para las mutantes Gly13:Asp y Gly80:Ala, la estabilidad aumentó, mientras que la enantioselectividad se vio reducida con respecto a la enzima silvestre.

El mismo grupo de mutantes utilizadas por Herrera (2014), fue utilizado para explorar otras propiedades del sitio activo de esta enzima. Se determinaron los parámetros cinéticos, k_{cat} y K_M , mediante el análisis de curvas de progreso de reacción. Como sustratos se usó el 4-nitrofenil acetato, como éster modelo, y el bencil-4-nitrofenil carbonato, como modelo de sustrato promiscuo de las lipasas.

Resultados previos indicaban que la BpIA era capaz de degradar al bencil-4-nitrofenil carbonato y al dimetilcarbonato (Likhatcheva, 2009). Los resultados mostraron que las mutaciones efectivamente tienen efectos diversos sobre la k_{cat} y K_M . Dichos efectos son incluso antagónicos si comparamos los resultados obtenidos con los dos sustratos ensayados. Un resultado sobresaliente es el incremento de 20 veces en la k_{cat} de la mutante Gly80:Ala para la hidrólisis del bencil-4-nitrofenil carbonato, con respecto a la enzima parental (Janacua, 2014). Un último dato de interés para este trabajo, es que la BpIA se comporta como unidad de plegamiento autónomo *in vitro*, esto implica que no requiere asistencia para su plegamiento. Esto le ha permitido ser fusionada a una proteína de la cápside del parvovirus B19, y aún en estas condiciones plegarse y mantener su actividad (Gutiérrez, 2014).

4. Lipasa unida a un dominio de hélice superenrollada

Como un antecedente directo al presente trabajo, un grupo de investigación europeo construyó un grupo de quimeras mediante la fusión de un dominio de hélice superenrollada a varias enzimas de interés comercial, entre ellas a la BslA (Diener *et al.*, 2016). Como ya se mencionó, las lipasas catalizan las reacciones en medios de reacción no convencionales. Del mismo modo, las enzimas inmovilizadas mejoran su estabilidad operacional, al grado que amplían el alcance y eficacia de estos biocatalizadores (Doukyu & Ogino, 2010). La construcción formada por una lipasa unida a un dominio de hélice superenrollada podría permitir la inmovilización de enzimas, facilitando su manejo y reciclaje. Aunque se han desarrollado diferentes métodos de inmovilización, muchos requieren optimización para obtener una relación costo-eficiencia adecuada. La construcción lipasa unida un dominio de hélice superenrollada da la oportunidad de tener una producción sencilla y rentable de gran cantidad de enzimas inmovilizadas (Diener *et al.*, 2016). En su experimento, Diener y colaboradores fusionan el dominio de hélice superenrollada TdoT (*Tetramerization domain of the cell-surface protein Tetrabrachion*) de la archaea de aguas profundas *Staphylothermus marinus*, al extremo N-terminal de la BslA (Figura 10). Este dominio de oligomerización permite la interacción de 4 hélices para formar una hélice superenrollada de 4 proteínas distintas. La proteína quimérica resultante

Introducción

no fue soluble, sin embargo, retuvo su actividad catalítica. Esta proteína insoluble pero activa, puede ser utilizada como cuerpos de inclusión con actividad catalítica (CatIBs) para diversos fines en los que sea necesario recuperar y reciclar al biocatalizador.

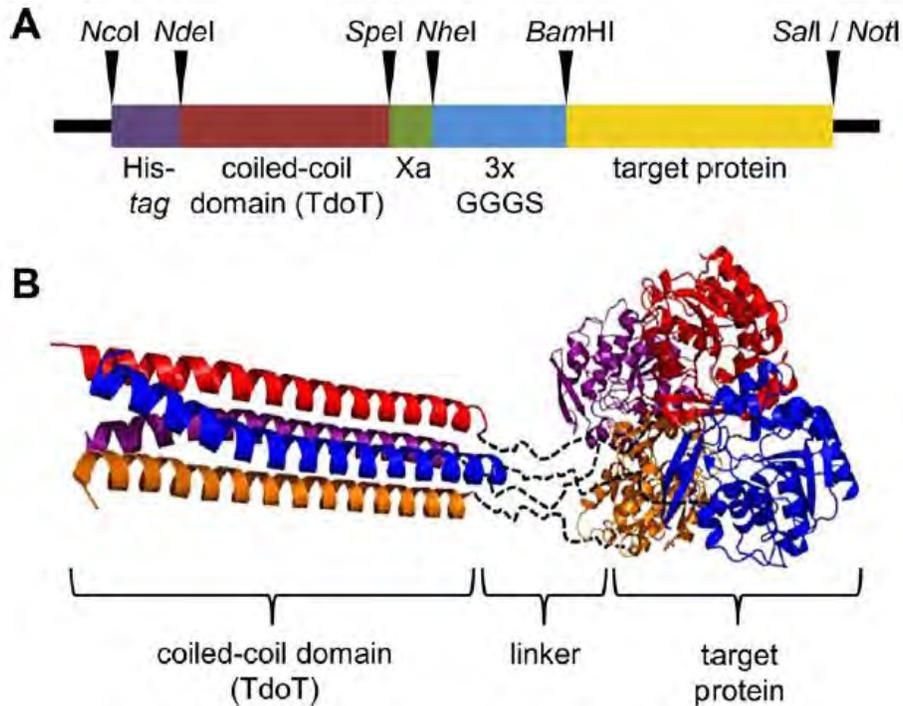


Figura 10. Ilustración esquemática de la construcción enzima-dominio de hélice superenrollada. A) estructura simplificada del gen en el plásmido pET28a mostrando las partes codificantes. El enlazador entre la enzima y el dominio de hélice superenrollada está formado por un motivo (GGGS) x 3 y el sitio de escisión para la proteasa factor Xa. B) modelo ilustrativo de la construcción enzima-dominio de hélice superenrollada (Diener et al., 2016).

V. Planteamiento del problema

El encuentro de las nanociencias, la biología sintética y la biotecnología ha hecho posible la construcción de nuevos materiales en escala nanométrica a partir de fragmentos de biomoléculas. Estos materiales tienen potenciales aplicaciones comerciales en diversos campos, como la medicina, la catálisis y la investigación. Sin embargo el desarrollo de estos biomateriales está en etapas tempranas de desarrollo y necesita crear modelos para ser puestos a prueba y posteriormente generar productos biotecnológicos.

El empleo de lipasas en la industria ha tenido un gran éxito debido a las múltiples aplicaciones de estas enzimas. Su unión con dominios de oligomerización, como los de hélices superenrolladas, abre un nuevo horizonte de aplicaciones al permitir anclar a estas enzimas en la superficie de distintos materiales decorados con dominios complementarios de alta afinidad.

La lipasa de *Bacillus pumilus* (BplA) ha sido un modelo interesante de enzima lipolítica. Su facilidad de expresión, manipulación y plegamiento, además de su plasticidad para formar quimeras, la hacen un modelo particularmente útil en este proyecto. Nos proponemos estudiar el efecto que tiene la fusión de los dominios heterodimerizantes K-coil y E-coil sobre las propiedades bioquímicas de esta lipasa.

VI. Hipótesis y objetivos

1. Hipótesis

Las quimeras formadas por cada uno de los péptidos heterodimerizantes, E-coil y K-coil, y la lipasa de *B. pumilus*, no afectan negativamente las propiedades catalíticas y la estabilidad de la enzima.

2. Objetivo principal

- Producir y caracterizar las quimeras de la lipasa de *B. pumilus* unidas a los péptidos heterodimerizantes E-coil y K-coil.

3. Objetivos particulares

- Diseñar los genes que codifiquen para las quimeras propuestas.
- Expresar y purificar las quimeras de diseñadas.
- Caracterizar cinéticamente las enzimas quiméricas.
- Medir la estabilidad térmica de las enzimas quiméricas.
- Evaluar la formación de heterodímeros con las quimeras.
- Caracterizar las especies heterodiméricas por métodos hidrodinámicos.

VII. Material y métodos.

1. Tablas de materiales

Especificación de los reactivos, equipos, y procedimientos utilizados en el presente estudio.

1.1. Materiales

Tabla 3. Reactivos químicos.

Reactivo	Marca
Reactivo Ácido bicinconínico (BCA)	Sigma
Ácido etilendiaminotetracético (EDTA)	Sigma
Agar	Sigma
Albúmina bovina	Sigma
Ampicilina	Sigma
Bicarbonato de sodio anhidro (NaHCO ₃)	Sigma
Carbonato de Sodio anhidro (Na ₂ CO ₃)	Sigma
Cloruro de sodio (NaCl)	Sigma
Fosfato monobásico de potasio (KH ₂ PO ₄)	Sigma
Glicerol	Sigma
Cloruro de guanidinio (GuHCl)	J. T. Baker
Hidróxido de sodio (NaOH)	J. T. Baker
Imidazol	Sigma
IPTG	Sigma
L-arginina	Sigma
Medio SOC	-
4-Nitrofenil acetato (pNFA)	J. T. Baker
4-Nitrofenol	Sigma
Reactivos para electroforesis	Sigma
Sulfato de cobre (CuSO ₄)	Sigma
Tributirina	Sigma
Triton X100	Sigma

1.2. Composición de amortiguadores y disoluciones

Tabla 4. Reactivos para llevar a cabo la digestión de plásmidos.

Disolución	Reactivos	Volumen (µL)
Master mix.	Enzima <i>NdeI</i>	2.5
	Enzima <i>XhoI</i>	2.5
	Amortiguador 3.1	3
	BSA 100x (albumina)	0.3
	Agua destilada	24

Tabla 5. Amortiguadores para el lavado de cuerpos de inclusión: *KcBpIA*

Amortiguador	Número	Características	pH
Lisis (primer lavado)	1	Fosfato monobásico de potasio 50 mM	7.5
		Cloruro de sodio 0.3 M	
Segundo lavado	2	Fosfato monobásico de potasio 50 mM	7.5
		Cloruro de sodio 0.3 M	
		Tritón X100 1%	
Tercer lavado	3	Fosfato monobásico de potasio 50 mM	7.5
		Cloruro de sodio 0.3 M	
		Guanidinio 5M	

Tabla 6. Amortiguadores para la purificación de la quimera *KcBpIA*

Amortiguador	Número	Características	pH
Replegamiento	-	Fosfato monobásico de potasio 50 mM	
		Cloruro de sodio 0.3 M	
		L-arginina 0.2 M	
Lisis	1	Fosfato monobásico de potasio 50 mM	7.5
		Cloruro de sodio 0.3 M	
		Cloruro de guanidinio 5 M	
Equilibrado	2	Fosfato monobásico de potasio 50 mM	7.5
		Cloruro de sodio 0.3 M	
		Cloruro de guanidinio 5 M	

Materiales y métodos

Lavado	3	Fosfato monobásico de potasio 50 mM 7.5 Cloruro de sodio 0.3 M Cloruro de guanidinio 5 M Imidazol 75 mM
Elución	4	Fosfato monobásico de potasio 50 mM 7.5 Cloruro de sodio 0.3 M Cloruro de guanidinio 5 M Imidazol 125 mM
Limpieza	5	Fosfato monobásico de potasio 50 mM 7.5 Cloruro de sodio 0.3 M Cloruro de guanidinio 5 M Imidazol 275 mM

Tabla 7. Amortiguadores para la purificación de la quimera EcBpIA

Amortiguador	Número	Características	pH
Lisis	1	Fosfato monobásico de potasio 50 mM Cloruro de sodio 0.3 M	7.5
Equilibrado	2	Fosfato monobásico de potasio 50 mM Cloruro de sodio 0.3 M	7.5
Lavado	3	Fosfato monobásico de potasio 50 mM Cloruro de sodio 0.3 M Imidazol 75 mM	7.5
Elución	4	Fosfato monobásico de potasio 50 mM Cloruro de sodio 0.3 M Imidazol 125 mM	7.5
Limpieza	5	Fosfato monobásico de potasio 50 mM Cloruro de sodio 0.3 M Imidazol 275 mM	7.5

1.3. Equipos.

Tabla 8. Equipos.

Equipo	Marca
Cámara de electroforesis	BioRad
Centrifuga	Eppendorf
Resina para cromatografía de afinidad a níquel	Macherey-Nagel
Espectrofotometro	Beckman
Espectrofotómetro CARY 400	Varian
Incubadora orbital	MaxQ5000
Microcentrífuga refrigerada 5417R	Eppendorf
Micropipetas (5, 10, 20, 100, 200, 1000 µL)	Eppendorf
Potenciómetro	Oakton
Sonicador CV26	Cole Parmer
Thermomixer	Eppendorf
Secador de vacío	Savant
Vortex	
Micropulser	Biorad

2. Método

2.1. Diseño de las quimeras.

Las quimeras se diseñaron con base en la información disponible sobre la BpIA y los propios péptidos heterodimerizantes. La BpIA ha sido clonada y expresada en *E. coli* (Bustos et al., 2010). Su purificación se logró mediante la inclusión de una etiqueta de His en el extremo carboxilo terminal de la molécula. En este caso proponemos conservar esta construcción exitosa y adicionar los péptidos heterodimerizantes en el extremo amino terminal de la enzima. Estos péptidos estarán separados por una región espaciadora que permitirán mantener a la enzima separada de las regiones heterodimerizantes. Las quimeras serán referidas como EcBpIA y KcBpIA

2.2. Transformación bacteriana.

Las construcciones se sintetizaron químicamente por la compañía Epoch Life Science. Los genes sintéticos se insertaron en el vector de expresión pET22b+, entre los sitios de restricción *NdeI* y *XhoI*, asegurando que el marco de lectura del gen sea el mismo que el de la etiqueta de His en el C-terminal. De este modo se generaron los plásmidos denominados pET-EcBpIA y pET-KcBpIA, mismos que se usaron para transformar células competentes de *E. coli* BL21(DE3). La transformación se realizó por choque térmico, se colocaron los tubos con la suspensión celular en baño de hielo por 30 min, después se colocaron en un Termoblock a 42° C durante 50 s, transcurridos los 50 s se colocaron inmediatamente en baño de hielo. Por último se agregaron 500 µL de medio SOC, se dejó recuperar a las células por una hora a 37°C a 250 rpm. Por último se sembraron 50 µL en cajas con medio LBamp con una concentración final de 50 µg/mL.

2.3. Purificación de plásmidos.

La purificación de los plásmidos se llevó a cabo mediante el protocolo de purificación de lisis alcalina (Mora, 2008). Se cultivó la cepa en 50 mL de medio LBamp por 18 h a 37°C con agitación constante de 250 rpm. Se obtuvo la biomasa por centrifugación a 5,000 rpm por 10 minutos, después se resuspendieron las células con 2 ml de amortiguador TE (tris 10 mM y EDTA 0.2 mM pH 8. Se agregó 1 mg de lisozima e incubó a 37°C durante una hora, posteriormente se adicionaron 100 µl de SDS 10%, se mezcló suavemente e incubó a 37°C durante una hora. Se colocaron 200 µl de NaCl 5 M y se mezcló suavemente, se colocaron 200 µl de solución de CTAB/NaCl (10%/0.7 M), nuevamente se mezcló suavemente y se puso a 15 min a 65°C. Se adiciono un volumen de fenol-cloroformo (1:1), se mezcló suavemente hasta que desapareció la fase orgánica (inferior) y se centrifugó a 14,000 rpm por 10 min. Después se transfirió la fase acuosa (superior) a un tubo limpio y se agregaron 0.6 volúmenes de 2-propanol, se mezclaron suavemente por inversión y se centrifugo a 14,000 rpm por 5 min. Se descartó el sobrenadante. Por

Materiales y métodos

último se adicionó 1 ml de etanol al 70%, y se mezcló suavemente por inversión y nuevamente se centrifugó a 14,000 rpm por 1 min. Se descartó el sobrenadante. Se repitió el paso anterior dos a tres veces hasta que desapareció el olor a fenol de la muestra. Y se dejó secar el ADN a 50°C con vacío y guardarlo a 4°C hasta ser usado. NOTA: Al usar el ADN purificado, resuspenderlo en 1 ml de amortiguador TE o agua destilada estéril.

2.4. Digestión del plásmido purificado

Para corroborar la identidad de los plásmidos recuperados de las células transformantes, se sometió a una digestión con las enzimas *NdeI* y *XhoI*, ya que los genes quiméricos fueron clonados entre estos sitios de restricción. Se agregaron 20 μ L de amortiguador TE y se resuspendió, posteriormente se tomó 1 μ L al cual se le agregaron 4 μ L de master mix (ver Tabla 4). Posteriormente se corrió un gel de agarosa 1% con amortiguador TAE y se tiñó con bromuro de etidio.

2.5. Prueba de actividad con tributirina.

Se realizó una prueba rápida para observar a simple vista la hidrólisis del sustrato tributirina (Jaeger et al., 1999) por la lipasa. Se preparó agar LB adicionado con 0.5% de tributirina, se emulsificó por agitación mecánica y se esterilizó. Posteriormente se dejó enfriar y se agregó ampicilina a una concentración de 50 μ g/mL e IPTG a una concentración final de 0.25 mM. Se prepararon cajas Petri con este medio y se dejó gelificar. Se inocularon células de *E. coli* BL21(DE3) transformadas con uno u otro de las plásmidos pET-EcLBpl6H o pET-KcLBpl6H y se incubó toda la noche a 37°C.

2.6. Expresión de las quimeras.

Para la producción de las quimeras, se sembraron células de *E. coli* BL21(DE3) previamente transformadas con el plásmido pET-EcBplA o con el

Materiales y métodos

plásmido pET-KcBpIA en placas de medio LBamp. Se seleccionó una colonia y se inoculó en un tubo de 10 mL con medio de cultivo líquido LB adicionado con ampicilina 50 µg/mL, se incubó toda la noche a 37°C con agitación orbital de 250 rpm. Se escaló a un matraz de 500 mL con 50 mL de cultivo LB líquido con ampicilina 50 µg/mL, y se incubó a 37°C con agitación orbital de 250 rpm, durante 2 horas. Por último se pasó a un matraz con 250 mL medio de cultivo LB líquido con ampicilina 50 µg/mL, y se dejó crecer hasta alcanzar una DO₆₀₀ de aproximadamente 0.6 (~3 h). En este momento se realizó la inducción de las células para la producción de la proteína agregando IPTG al medio de cultivo a una concentración final de 0.25 mM, y se dejó incubar a 37°C con agitación orbital de 250 rpm por 12 h. En el caso de la quimera con el tectón E-coil, la temperatura de inducción fue 25°C. Para cosechar las células, se centrifugó a 5000 rpm por 15 min. La expresión de las proteínas se analizó por SDS-PAGE.

2.7. Obtención de extracto celular.

Las células se resuspendieron las células en amortiguador de lisis (Amortiguador 1), se puso la muestra en hielo y se continuó con la sonicación, la cual consistió en pulsos de 20 segundos y 40 segundos de descanso, por 25 minutos para KcBpIA, y por 20 minutos para EcBpIA. Después se centrifugó a 13,000 rpm por 5 min. En el caso de EcBpIA lo que se conservó, fue el sobrenadante (fracción soluble), que es el extracto celular, a 4°C. Pero para la quimera KcBpIA, se tuvo que lavar los cuerpos de inclusión, puesto que dicha proteína no se queda en fracción soluble.

2.8. Lavado de cuerpos de inclusión.

Una vez que la muestra fue lisada por sonicación, y centrifugada, se resuspendió el pellet (cuerpos de inclusión) con el amortiguador de lisis, se centrifugo a 13,000 rpm por 5 min y se desechó el sobrenadante; se continuó con un segundo lavado con el amortiguador de lisis más 1% de Tritón X100, se volvió a

centrifugar a 13,000 rpm por 5 min y nuevamente se quedó solo con el pellet. Por último, se realizó un lavado con amortiguador de lisis más 5 M de guanidinio, en este caso después de la centrifugación a 13,000 rpm por 5 min, la fracción soluble que nos queda, es la que se conservó. La expresión de las proteínas se analizó por SDS-PAGE.

2.9. Purificación de las quimeras.

Para purificar las quimeras se hizo uso de la etiqueta de His que ambas quimeras tienen en el extremo C-terminal. La columna de afinidad a níquel fue lavada con 4 volúmenes de agua desionizada y luego se le pasaron 3 volúmenes de amortiguador de equilibrado (amortiguador 2). Posteriormente se adicionó el total del sobrenadante del lisado (extracto celular o lavado de cuerpos de inclusión), y se hicieron pasar 3 volúmenes de amortiguador de lavado (amortiguador 3) (75 mM de Imidazol) (proteína no retenida), seguidos de 3 volúmenes de amortiguador de elución (amortiguador 4) (125 mM de Imidazol), y por último se pasaron 2 volúmenes de amortiguador de limpieza (amortiguador 5) (275 mM de Imidazol). Las fracciones obtenidas se analizaron por SDS-PAGE. El volumen obtenido de las fracciones donde se encontró la proteína fue puesto a dializar en amortiguador de fosfatos, que es el mismo que el de lisis. Se repitió el procedimiento 3 veces, hasta lograr purificar la proteína y la pureza se verificó por medio de SDS-PAGE. Se midió la concentración de ambas proteínas por el método del BCA. Los volúmenes de amortiguador son con guanidinio para KcBpIA, y sin guanidinio para EcBpIA (Tablas 6 y 7 respectivamente).

2.10. Determinación de la concentración de proteína.

Se calculó la concentración de ambas proteínas con el método de ácido bicinónico (BCA). Este método se basa en el hecho de que los iones de Cu^{+2} formados en condiciones alcalinas se ligan al enlace peptídico de los aminoácidos en las proteínas. Este complejo es detectado por la reacción con el BCA

Materiales y métodos

produciendo un color púrpura intenso, que es proporcional a la cantidad de proteína, que se midió con un espectrofotómetro a 562 nm.

Se preparó el reactivo BCA como se indica en la siguiente (tabla 15 del apéndice 2). Se diluyeron 10 μL de la proteína de interés con 90 μL de agua destilada 10:1, y se adicionó 1 mL de la mezcla BCA- Cu^{2+} , se mezcló perfectamente e incubó a 37°C durante 30 min. Las muestras adquirieron un color púrpura intenso. Se midió la absorbancia a 562 nm. Para calcular la concentración de la proteína se dividieron las absorbancias obtenidas entre la pendiente de una curva patrón de albúmina bovina ($\text{Abs}_{562}/[\text{mg}/\text{ml}]$) y el resultado obtenido se multiplicó por el inverso del factor de dilución. El proceso se hizo por duplicado y se obtuvo el promedio.

2.11. Estabilidad de las enzimas quiméricas.

La estabilidad de las proteínas se determinó mediante el cambio de la actividad residual en función del tiempo (3 h), a una temperatura fija (25°C). Estos datos se ajustan a una función exponencial para calcular la constante cinética de inactivación (k_{ie}). El valor de esta constante es inversamente proporcional a la estabilidad de la enzima.

Se hizo el seguimiento de la actividad hidrolítica residual después de ser incubada a 25°C a tiempos variables, usando como sustrato al 4-nitrofenil acetato (4NFA). En una celda con capacidad de 1 mL, se adicionó la siguiente mezcla: 10 μL de sustrato 4NFA de una solución 10 mM disuelto en acetonitrilo, 970 μL de amortiguador 1 de lisis, pH 7, y 20 μL de enzima. Se midió el cambio de absorbancia en el tiempo a 410 nm ($\text{Abs}_{410}/\text{min}$) contra un blanco (amortiguador 1) a 25°C durante 2 min, en un espectrofotómetro CARY 400 (Varian). Se calculó la actividad inicial ($\mu\text{M}/\text{min}$) empleando el valor de la pendiente que se obtiene a partir del cambio de absorbancia y la pendiente de una curva patrón de 4-nitrofenol (4NF) ($\text{Abs}_{410}/\mu\text{M}$). La enzima se incubó a 25°C sin agitación, y a tiempos determinados se tomaron alícuotas de la enzima en estudio y se les determinó su actividad residual. Se hizo la gráfica del logaritmo natural los valores de actividad relativa

($\ln(\text{Act}_t / \text{Act}_0)$), entre la actividad al tiempo t (Act_t) y la actividad inicial (Act_0), contra el tiempo. La pendiente del gráfico equivale a el valor negativo de la constante cinética de inactivación térmica, $-k_{ie}$.

2.12. Caracterización cinética de las quimeras.

Se estudió la cinética enzimática de las quimeras de la lipasa determinaron los parámetros cinéticos mediante el análisis de sus curvas de progreso de reacción. Este análisis se basa en que, a una concentración dada de sustrato, la velocidad de la enzima debe cumplir una ecuación de velocidad cuyas k_{cat} y K_M pueden ser ajustadas a partir de los datos de la curva. Para ello usamos un método colorimétrico basado en la hidrólisis de 4NFA para producir 4NF, el cual absorbe en la región visible a 410 nm. Los sustratos de las lipasas suelen ser insolubles o poco solubles en medio acuoso, por esta razón, un sustrato cromogénico como el 4NFA es una buena opción. La absorbancia se midió con un espectrofotómetro CARY 400 (Varian). Las curvas de progreso de reacción se miden a distintas concentraciones conocidas de sustrato y una concentración de enzima. Posteriormente todas las curvas se utilizan para resolver, por métodos numéricos, la ecuación diferencial de velocidad del sistema.

A una celda con capacidad de 1 mL, se le adicionaron 10 μL de 4NFA 10 mM disuelto en acetonitrilo, 970 μL de amortiguador 1 de lisis, pH 7, y 20 μL de enzima. Se midió el progreso de la reacción a 25°C durante 3 h. Se realizaron los mismo pasos, pero ahora se adicionaron 6 μL de 4NFA 10 mM disuelto en acetonitrilo, 974 μL de lisis (amortiguador 1), pH 7, y 20 μL de enzima y 3 μL de 4NFA 10 mM disuelto en acetonitrilo, 976 μL de lisis (amortiguador 1), pH 7, y 20 μL de enzima. A partir de los datos anteriores, se calculó la formación del producto, 4NF, y el consumo de sustrato en el tiempo. Para ello se empleó el valor de la pendiente de una curva patrón de 4NF en el mismo amortiguador en que se llevó a cabo la reacción enzimática ($\text{Abs}_{410}/\mu\text{M}$). Se alimentó el programa Encora 1.2 (Straathof, 2001) con los datos de progreso de reacción, las concentraciones de sustrato, y el valor de k_{ie}

de cada enzima, para obtener los valores de k_{cat} , K_M correspondientes. El programa se basa en la integración numérica de la ecuación diferencial de Michaelis-Menten-Henry por el método de Runge-Kutta. Este programa puede considerar la constante de inactivación de la enzima e inclusive la hidrólisis química del sustrato, si las hay.

2.13. Análisis de la formación de heterodímeros por centrifugación isopícnica mediante gradientes continuos de cloruro de cesio (CsCl).

Para evaluar la capacidad de estas quimeras para interactuar con materiales complementarios, se intentó formar heterodímeros mediante la mezcla de estas quimeras y su detección en gradiente isopícnico de cloruro de cesio. Se preparó un amortiguador a pH 7.4, con la siguiente composición: 50 mM de fosfatos, 10 mM de EDTA, 0.5% Tritón X-100. Posteriormente se mezclaron exactamente 79.2 mL de este amortiguador con 40.8 g de CsCl para tener una solución de 1.33 g/mL (solución de CsCl). Se colocaron 3.5 mL de la solución de CsCl en un tubo de centrifuga de 5 mL (Ultra-Clear, Beckman 11 x 60 mm) y sobre ésta, procurando no mezclar, se adicionaron 0.5 mL de proteína dializada a una concentración entre 0.3 y 0.5 mg/mL. En el caso, de la formación del heterodímero, las dos quimeras se mezclaron e incubaron por 20 h a 4°C. La ultracentrifugación se realizó con un rotor SW 60Ti (Beckman) a 55,000 rpm durante 10:43 h, a 20°C y sin frenado (Gutiérrez, 2014).

VIII. Resultados y discusión

1. Resultados.

1.1. Diseño de las quimeras.

Las quimeras fueron diseñadas partiendo del hecho de que el plegamiento α/β hidrolasa de la lipasa presenta el sitio activo en el extremo opuesto de la hoja β central, lejos de los extremos N- y C-terminales. Incluimos un residuo de Met seguido de un residuo de Gly como primeros residuos en el extremo N-terminal. Posteriormente incluimos cinco veces la heptada correspondiente a cada tectón. Al término de las repeticiones de cada heptada se incluyó un péptido separador para mantener alejada a la enzima del péptido, compuesto por residuos de Gly y Ser. Finalmente se añadió la secuencia de la forma madura de la BpIA, seguida de una etiqueta de seis residuos de His que facilitarían su purificación. En la Tabla 9 se muestra la secuencia de aminoácidos de cada construcción.

Tabla 9. Secuencia de aminoácidos de las quimeras EcBpIA y KcBpIA.

> EcBpIA

*MGEVSALEKEVSALEKEVSALEKEVSALEKEVSALEK***GGSGGSGGSGG**MAEHNPVVMVHGIGGAS
YNFFSIKSYLVGQGWDRNQLYAIDFIDKTGNNRNNGPRLSRFVKDVLDKTGAKKVDIVAHSMGGA
NTLYYIKNLDGGDKIENVVTIGGANGLVSSRALPGTDPNQKILYTSVYSSADLIVVNSLSRLIGA
RNVLIHGVGHIGLLTSSQVKGYIKEGLNGGGQNTNHHHHH

> KcBpIA

*MGKVSALKEKVSALKEKVSALKEKVSALKEKVSALKE***GGSGGSGGSGG**MAEHNPVVMVHGIGGAS
YNFFSIKSYLVGQGWDRNQLYAIDFIDKTGNNRNNGPRLSRFVKDVLDKTGAKKVDIVAHSMGGA
NTLYYIKNLDGGDKIENVVTIGGANGLVSSRALPGTDPNQKILYTSVYSSADLIVVNSLSRLIGA
RNVLIHGVGHIGLLTSSQVKGYIKEGLNGGGQNTNHHHHH

En cursiva, los residuos de Met y Gly en el extremo N-terminal y la etiqueta de His en el extremo C-terminal. Subrayado, el heptapéptido E- o K- coil. En negritas, el péptido separador. La secuencia de la BpIA se encuentra entre el péptido separador y la etiqueta de His. Sombreados en gris, los residuos de la triada catalítica, Ser77, Asp133 e His156 de acuerdo a la numeración de la BpIA.

Resultados y discusión

Las construcciones planeadas incluyeron a los tectones E-coil y K-coil, previamente diseñados (De Crescenzo et al, 2003) (Figura 11). Los genes que codifican para estas construcciones fueron sintetizados químicamente por la compañía Epoch Life Science Inc. y se subclonaron en el vector de expresión pET22b(+). La secuencia completa de nucleótidos para ambas construcciones y el vector se encuentran en el Apéndice I. Los plásmidos resultantes se denominaron pET-EcBpIA y pET-KcBpIA.

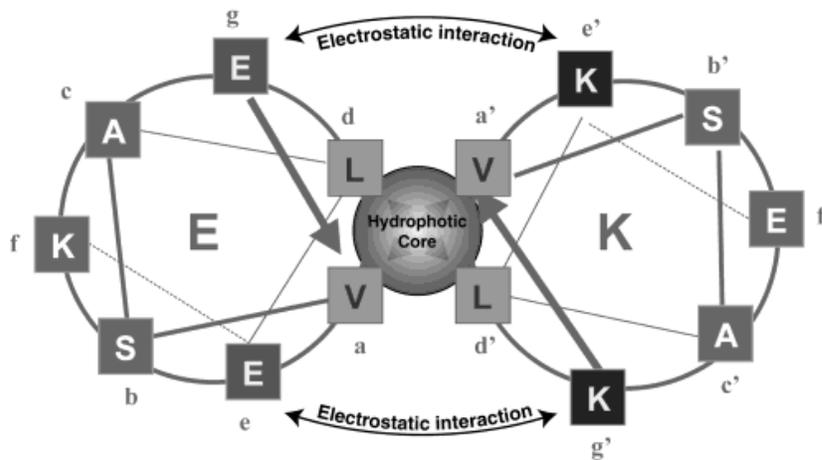


Figura 11. Representación de la sección transversal de la hélice superenrollada E/K. Las interacciones hidrofóbicas intercatenarias se indican con el círculo central. Las flechas indican los pares de residuos con interacciones electrostáticas intercatenarias en cada lado del núcleo hidrofóbico (De Crescenzo et al, 2003).

1.2. Análisis de los plásmidos pET-EcBpIA y pET-KcBpIA

Los plásmidos pET-EcBpIA y pET-KcBpIA se utilizaron para transformar células competentes de *E. coli* BL21(DE3). Las células transformadas se seleccionaron en placas de agar LB con ampicilina. La purificación, digestión y análisis de los plásmidos, se realizó para tener la certeza de que las células transformadas tenían el plásmido correcto. El plásmido purificado se digirió con las enzimas de restricción *NdeI* y *XhoI* y se analizó por electroforesis en gel de agarosa (Figura 12). El plásmido no digerido produjo varias bandas que corresponden a topoisómeros y formas concatenadas del plásmido. Después de la digestión, se observan solamente dos bandas, una de aproximadamente 5.5 kbp y la otra

Resultados y discusión

alrededor de 0.7 kbp. Estos pesos coinciden perfectamente con los pesos del vector vacío, que es de 5.5 kbp, y de los genes de las quimeras, que son de 693 pares de bases.

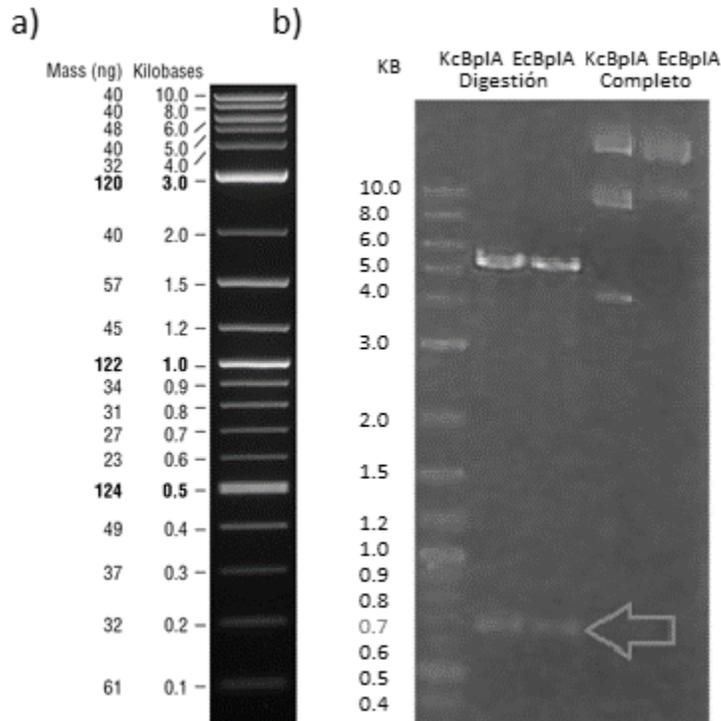


Figura 12. Análisis de plásmidos por electroforesis. a) 2-Log DNA Ladder visualizado por tinción con bromuro de etidio en un gel de TBE agarosa al 1,0%. b) y análisis de los plásmidos después de la purificación y digestión, señalando el plásmido digerido con una flecha, en el que el plásmido en ambos casos tiene 693 nucleótidos, y por lo que se logra apreciar si salió cerca de 700=0.7kilobases.

1.3. Prueba de actividad con tributirina.

Para comprobar que las quimeras tuvieran actividad realizamos una prueba sencilla de actividad basada en la hidrólisis de tributirina. En esta prueba se emulsifica un poco de tributirina en agar LB con ampicilina e IPTG. Al solidificar el agar, este presenta opalescencia debido a la presencia de las gotas de aceite de la emulsión. Estas placas se sembraron con colonias transformantes obtenidas con cada uno de los vectores que contienen a las dos quimeras de la lipasa. Tras una incubación de 16 h a 37°C, se observó un halo de hidrólisis alrededor de las células

Resultados y discusión

que crecieron, lo que los indica que los vectores de expresión funcionan y que las lipasas quiméricas son activas (Figura 13).

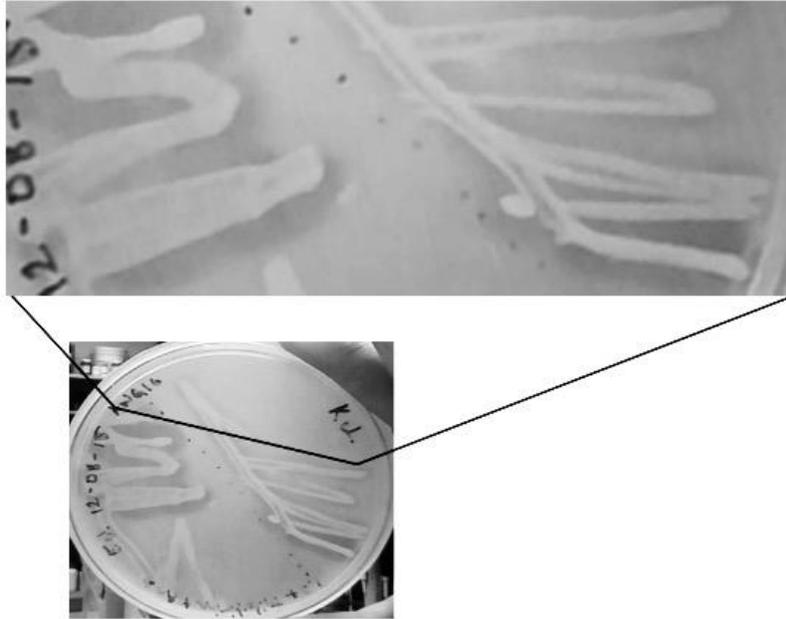


Figura 13. Prueba de actividad lipolítica en agar LB con tributirina al 0.5% e IPTG 0.25 mM. En el lado izquierdo se encuentran las células de *E. coli* BL21(DE3) transformadas con el plásmido pET-EcBpIA, mientras que del lado derecho las mismas células se transformaron con el plásmido pET-KcBpIA. En ambos casos se puede apreciar el halo de hidrólisis que hay alrededor de las células.

1.4. Expresión de las proteínas quiméricas.

La expresión de las quimeras EcBpIA y KcBpIA se llevó a cabo como se describe en la sección de Materiales y Métodos. El análisis de la inducción por IPTG se analizó por electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE). El perfil de proteínas totales de las células bacterianas, antes y después de la inducción, se observa en la Figura 14. El análisis bioinformático de la secuencia (ExpASy-ProtParam tool) nos indica que sus masas moleculares relativas son 24941.3 y 24946.0 Da, para KcBpIA y EcBpIA respectivamente, con puntos isoeléctricos de 9.65, y 7.2. En el gel se puede observar que, en el caso de la proteína EcBpIA, el peso es muy cercano al predicho. Sin embargo, en el caso de la quimera KcBpIA, el peso está muy por debajo de lo esperado. Los cambios de masa molecular relativa aparente son bien conocidos, y

Resultados y discusión

han sido asociados a la presencia de dominios con carga (Shy et al., 2012). En tal caso sería esperable que la quimera EcBpIA tuviera una mayor movilidad, cosa contraria a la que ocurrió. Otra hipótesis es que el tectón adicionado, de algún modo, esté promoviendo el plegamiento de la proteína generando una especie más compacta en el gel que, en consecuencia, tendría una mayor movilidad electroforética. El análisis de la secuencia del plásmido indica que la construcción es correcta (Apéndice), por lo que sería difícil que estuviéramos trabajando con una forma trunca de la enzima. En todo caso, si hubiera formas truncas de la enzima, estas se eliminarían durante la purificación ya que la etiqueta de His está localizada en el extremo C-terminal de la enzima, que es lo último en sintetizarse en el ribosoma.

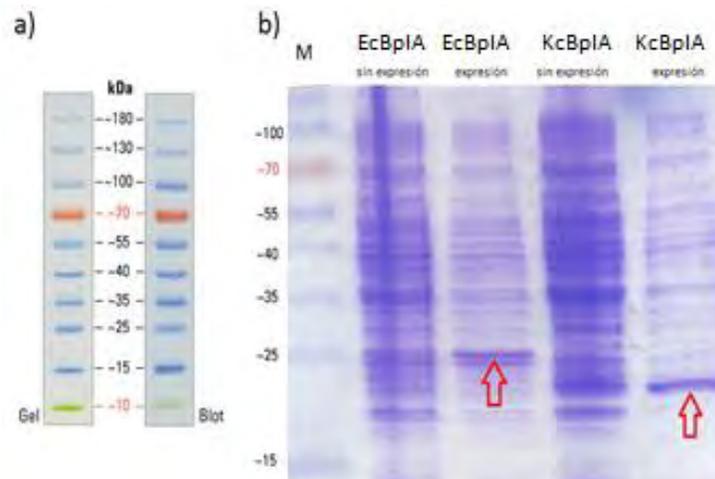


Figura 14. SDS-PAGE (expresión vs. sin expresión. a) perfil de bandas en SDS-PAGE de PageRuler prestained Protein Ladder (gel al 4-20% Tris-glicina (SDS-PAGE)). b) análisis de las muestras de biomasa sin inductor de ambas proteínas vs. la biomasa con inductor (ya expresa la proteína), en el gel se puede apreciar que para el caso de las células con inductor se marca una banda en específico en pesos entre 15 y 20, los cuales son correctos (el peso entre ambas puede variar por la diferencia entre sus puntos isoeléctricos, pensando que deberían pesar igual).

Las dos proteínas quiméricas se expresaron en *E. coli* y fueron localizadas tanto en la fracción soluble como en la insoluble. Para el caso de la proteína KcBpIA, se requirió hacer lavado de la fracción insoluble, debido a que la proteína se encontraba mayoritariamente en esta fracción (Figura 15). Después del lavado de los cuerpos de inclusión, la proteína fue resuspendida en el amortiguador de lisis (tabla 6), que contiene GndHCl 5 M. Posteriormente se replegó por diálisis contra

Resultados y discusión

un amortiguador de replegamiento (tabla 6), y la proteína resultante tuvo actividad esterasa. En contraste, la quimera EcBpIA no presentó actividad tras replegarse en las mismas condiciones que la proteína KcBpIA, por lo que se tuvo que trabajar exclusivamente con la proteína encontrada en el sobrenadante, que sí tenía actividad esterasa (véase sección de Métodos).

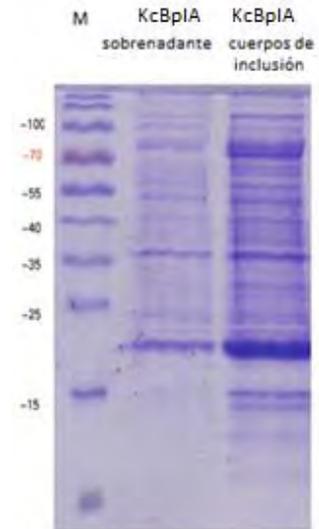


Figura 15. Proteína KcBpIA. En el gel se pueden observar ambas fracciones, tanto el sobrenadante después de la lisis por sonicación, como la fracción insoluble de la misma lisis; se puede observar que aparentemente hay más proteína en los cuerpos de inclusión.

1.5. Purificación de las proteínas quiméricas.

Las quimeras EcBpIA y KcBpIA se purificaron mediante cromatografía de afinidad a Ni en una columna Protino Ni-TED. En la Figura 16 se muestra la purificación de ambas proteínas. Se eligieron las fracciones que aparentan mayor pureza y se concentraron hasta un volumen razonable (10 a 20 mL), ya que tienden a agregarse; para el caso de KcBpIA que se purificó con GndHCl y se dializó para recuperar su actividad y quitar el imidazol. En el caso de la quimera EcBpIA, se dializó solamente para quitar el imidazol. Fue necesario purificar hasta en tres ocasiones la misma muestra para mejorar la pureza, mediante el mismo protocolo, es decir, una vez obtenidas las fracciones en donde se encontraba la proteína de interés, se concentraban y se les lavaba el imidazol, para posteriormente volver a pasarlas por la columna, así, hasta en tres ocasiones.

Resultados y discusión

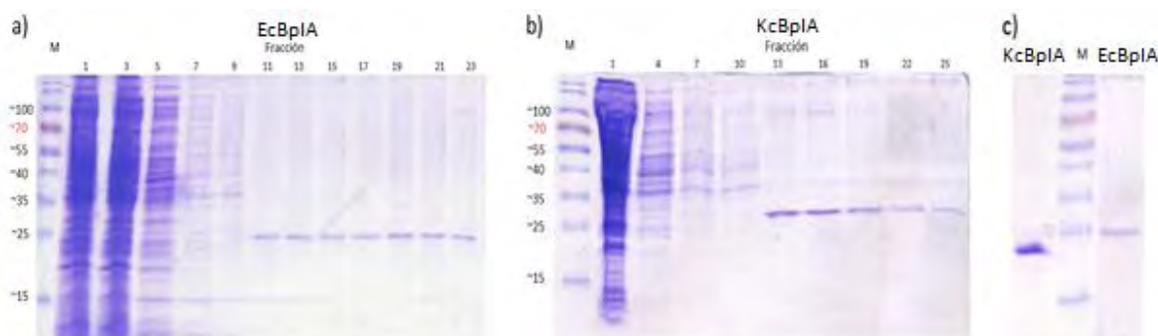


Figura 16. Purificación *EcBpIA* y *KcBpIA*. a) purificación *EcBpIA* (carriles 1-3 extracto celular, carriles 5-9 amortiguador de equilibrado, carriles del 11-15 amortiguador de lavado, carriles 17-19 amortiguador de elución, y por último del carril 21-23 amortiguador de limpieza), b) purificación *KcBpIA* (carriles 1-4 extracto celular, carriles 7-10 amortiguador de equilibrado, carriles del 13-16 amortiguador de lavado, carriles 19-22 amortiguador de elución, y por último el carril 25 amortiguador de limpieza), y c) ambas proteínas purificadas (editado para facilitar visualización).

1.6. Determinación de la concentración de proteína.

La determinación de concentración de las proteínas se realizó mediante el método del ácido bicinconínico, que se midió espectrofotométricamente a 562 nm. El proceso se hizo por duplicado y se obtuvo el promedio.

Tabla 10. Concentración de las quimeras *KcBpIA* y *EcBpIA* por BCA.

Enzima	mg/mL	mmol/mL	mg Totales	mL totales
KcBpIA	0.236	9.462×10^{-3}	3.54	15
EcBpIA	0.102	4.089×10^{-3}	2.04	20

1.7. Estabilidad de las enzimas quiméricas: determinación de las constantes de inactivación térmica (k_{ie}).

La estabilidad de las lipasas recombinantes se midió por medio de la obtención de las constantes de inactivación enzimática (k_{ie}). En todas ellas se utilizó el seguimiento de la actividad hidrolítica en el tiempo frente a 4NFA (Figura 17).

Resultados y discusión

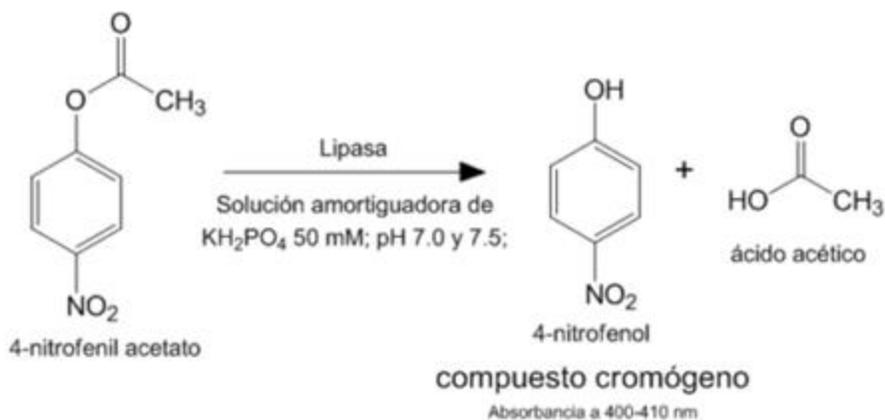


Figura 17. Reacción de hidrólisis de 4NFA catalizada por lipasas (Uribe, 2012).

Para calcular las constantes de inactivación enzimática se consideró que la enzima solo tiene dos estados, el nativo N (enzima con actividad) y el desnaturalizado D (enzima que carece de actividad). La transición de N a D está dada por:



Donde la velocidad del proceso está mediada tanto por la constante de inactivación como por la concentración de la enzima nativa (Ecuación 1):

$$v = k_{ie} [\text{N}]$$

La velocidad también puede expresarse en términos de la aparición de la enzima desnaturalizada en el tiempo:

$$d[\text{D}] / dt = k_{ie} [\text{N}]$$

Esta condición también puede expresarse en función de la enzima nativa:

$$-d[\text{N}] / dt = k_{ie} [\text{N}]$$

El signo negativo hace referencia a que la concentración de la enzima nativa disminuye a medida que ésta se desnaturaliza. Al agrupar términos de la ecuación anterior se obtiene:

$$-d[\text{N}] / [\text{N}] = k_{ie} dt$$

Al integrar ésta ecuación se tiene que:

$$\int (-d[\text{N}] / [\text{N}]) = k_{ie} \int dt$$

Integrando esta ecuación diferencial entre los límites 0 y t, obtenemos:

Resultados y discusión

$$-\ln ([N]_t / [N]_0) = k_{ie} t$$

La cual también se puede expresar así:

$$\ln ([N]_t / [N]_0) = -k_{ie} t$$

En este caso, la concentración inicial de la enzima, $[N]_0$, es proporcional a la actividad enzimática en el tiempo 0 (Act_0), ya que la enzima en estado nativo posee actividad. Por otro lado, la concentración de enzima en estado nativo en cualquier tiempo t , $[N]_t$, es proporcional a la actividad desarrollada en ese tiempo (Act_t). Por lo tanto se tiene que:

$$\ln (Act_t / Act_0) = -k_{ie} t$$

Para obtener el valor de k_{ie} se graficó $\ln (Act_t / Act_0)$ contra el tiempo, la pendiente de ese gráfico equivale a $-k_{ie}$.

El tiempo de seguimiento para observar la pérdida de actividad hidrolítica, fue de 3 h (Figura 18). Los tiempos de vida media se estimaron con base en los valores de k_{ie} obtenidos:

$$t_{1/2} = \ln 2 / k_{ie}$$

(Likhatcheva, 2009)

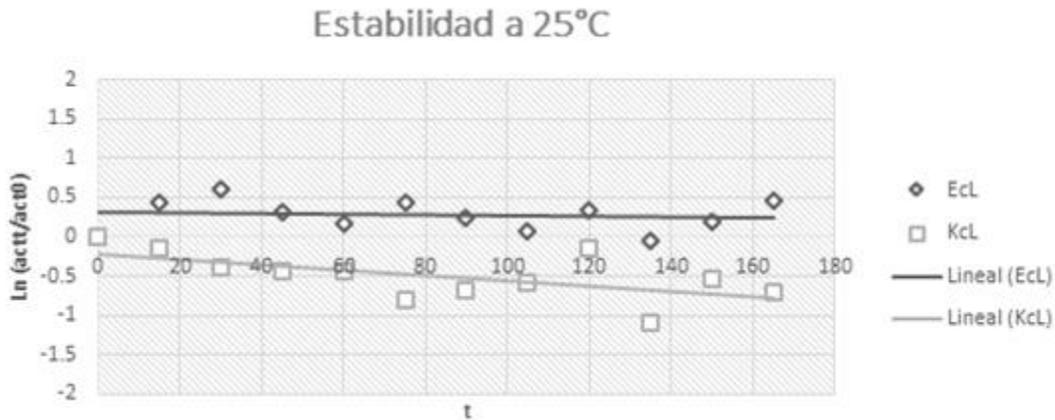


Figura 18. Gráfico del $\ln (Act_t/Act_0)$ en función del tiempo. Las pendientes corresponden a $-k_{ie}$ a 25°C.

La k_{ie} para EcBpIA corresponde a $0.5 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$, con una $t_{1/2}$ de 1386.3 min; para KcBpIA, el valor de k_{ie} es de $3.5 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$, con una $t_{1/2}$ de 198.0 min. La enzima recombinante no quimérica presentó una k_{ie} de $8.6 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ (Janacua,

2014). Si bien estos valores sugieren que las enzimas quiméricas son más estables que la BpIA, esto solo se cumple para la enzima diluida. Si las quimeras se concentran, estas son propensas a la agregación.

1.8. Caracterización cinética de las quimeras.

Los datos de las cinéticas realizadas (tres curvas por proteína) se ajustaron con el programa Encora 1.2. El programa se utilizó tomando en cuenta un solo sustrato (S) y un solo producto (P), aunque en la reacción participa una molécula de agua durante la hidrólisis, no se toma en cuenta, debido a que hay gran cantidad de moléculas, que no participan durante la hidrólisis, y los productos finales son dos, el 4NF, que es el producto que seguimos en el experimento, y el ácido acético. Se considera que el paso de S a P es irreversible, teniendo cuenta que la hidrólisis en medios acuosos es esencialmente irreversible. En el ajuste se consideró la inactivación enzimática en condiciones experimentales (k_{ie}), (constante calculada anteriormente) cuyos valores fueron de 0.5×10^{-3} y $3.5 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$, para EcBpIA y KcBpIA respectivamente. Se determinaron los parámetros cinéticos k_{cat} y K_M por la hidrólisis de 4NFA (Figura 19).

Las constantes cinéticas a 25°C (tabla 11) fueron las siguientes: $k_{cat} = 1.25 \text{ s}^{-1}$ (75.03 min^{-1}) y $K_M = 0.13 \text{ mM}$ para la proteína EcBpIA, mientras que para la quimera KcBpIA se obtuvo $k_{cat} = 1.07 \text{ s}^{-1}$ (64.45 min^{-1}) y $K_M = 0.37 \text{ mM}$. Las eficiencias catalíticas (especificidad, k_{cat}/K_M) fueron de 577.15 y $174.20 \text{ min}^{-1} \text{ mM}^{-1}$, para EcBpIA y KcBpIA respectivamente. Janacua (2014) reportó, para la enzima recombinante no quimérica, valores de k_{cat} , K_M y k_{cat}/K_M de 175.7 min^{-1} , 1.01 mM y $174.0 \text{ min}^{-1} \text{ mM}^{-1}$. Como podemos ver, existen cambios en los parámetros cinéticos, particularmente una disminución de k_{cat} a menos de la mitad del valor encontrado para la enzima silvestre. En contraste, la afinidad de la enzima por el sustrato mejoró significativamente. Como resultado encontramos que la especificidad de EcBpIA es aproximadamente tres veces mayor que la de la enzima silvestre, mientras que la especificidad de la KcBpIA no se ve afectada.

Resultados y discusión

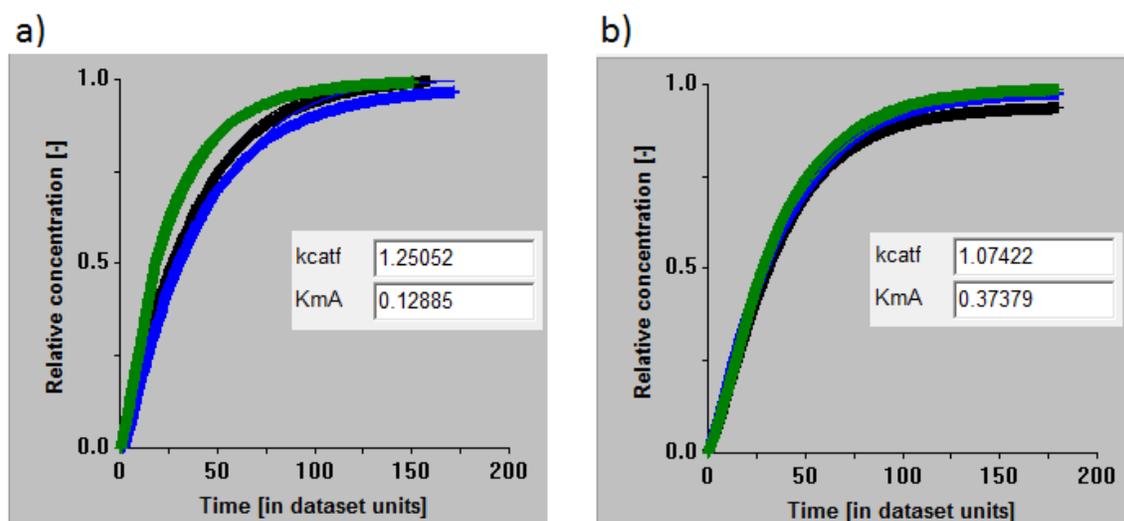


Figura 19. Curvas de progreso de reacción normalizadas para diferentes concentraciones de sustrato (4NFA) tal como se visualizan en el programa Encora 1.2. a) ajuste de datos para la obtención de las constantes cinéticas para la enzima EcBpIA. b) ajuste de datos para la obtención de las constantes cinéticas para la enzima KcBpIA. El valor de k_{catf} corresponde a k_{cat} , mientras que K_{mA} corresponde a K_M .

Tabla 11 Constantes cinéticas a 25°C

Proteína	k_{cat}	K_M	k_{cat}/K_M
EcBpIA	1.25 s^{-1} (75.03 min^{-1})	0.13 mM	$577.15 \text{ min}^{-1} \text{ mM}^{-1}$
KcBpIA	1.07 s^{-1} (64.45 min^{-1})	0.37 mM	$174.20 \text{ min}^{-1} \text{ mM}^{-1}$

1.9. Análisis de la formación de heterodímeros por centrifugación isopícnica mediante gradientes continuos de cloruro de cesio (CsCl).

Para demostrar la capacidad de los tectones E-coil y K-coil de interactuar entre ellos propusimos poner en contacto nuestras dos quimeras con la idea de observar la formación de especies de mayor peso molecular, lo cual se realizó por centrifugación isopícnica, aunque es muy posible que la densidad de un heterodímero de lipasa no fuese muy distinta del de cada una de las formas separadas de la enzima. El procedimiento para la centrifugación isopícnica se realizó siguiendo el protocolo de Gutiérrez (2014). Los gradientes revelaron bandas

Resultados y discusión

de proteína en diferentes densidades (Figura 20), las cuales se tomaron y dializaron para eliminar el exceso de CsCl.

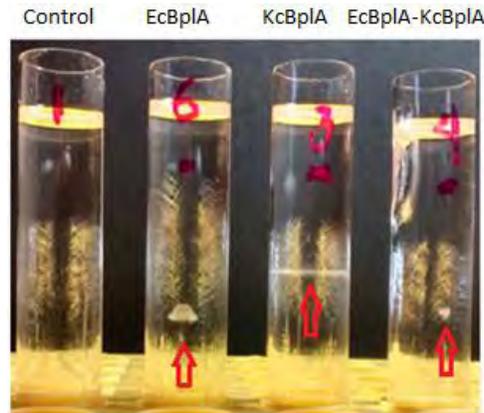


Figura 20. Gradientes de CsCl. El tubo marcado con el número 1 es el control, el tubo 6 es la proteína EcBplA, KcBplA en el tubo 3, y por último el tubo 4 con la interacción de ambas proteínas.

Desafortunadamente, al momento de hacer el análisis por SDS-PAGE, no apreció banda alguna. Esto podría deberse a que durante la diálisis la proteína se adhirió a la membrana de diálisis o a que la concentración de proteína era demasiado baja. Se repitió la centrifugación isopícnica concentrando más la proteína. Sin embargo, al momento de concentrar las muestras por ultrafiltración se presentó una agregación de las mismas, impidiendo realizar el experimento deseado. Ante esto, se intentó concentrar por medio de membranas de diálisis sobre una cama de polietilenglicol, pero de igual forma, la proteína se agregaba al disminuir el volumen. Cabe destacar que ambos procedimientos se realizaron también en presencia de 0.2 M de L-Arg, que evita la agregación.

IX. Conclusiones

Se diseñaron las quimeras EcBpIA y KcBpIA a partir de la secuencia de residuos de los tectones E-coil y K-coil, y la enzima BpIA. Estas quimeras se expresaron exitosamente en *E. coli*, y presentaron actividad lipolítica contra tributirina en medio sólido. Sin embargo, una fracción de estas proteínas permaneció en forma insoluble con los restos celulares tras la disrupción de las células.

La quimera EcBpIA no se puede replegar para recuperar su actividad hidrolítica en las condiciones aquí reportadas. En contraste, la quimera KcBpIA sí se puede replegar y recuperar su actividad de esterasa.

Las quimeras se purificaron mediante cromatografía de afinidad a metales y fueron caracterizadas.

La estabilidad de las enzimas quiméricas se evaluó a través de su constante de inactivación térmica (k_{ie}) a 25°C. Las enzimas quiméricas son estables a 25°C y presentaron mejor estabilidad que la enzima recombinante BpIA. Sin embargo, las quimeras tienen una propensión elevada hacia la agregación si se concentran.

Los valores de la caracterización cinética para la hidrólisis del 4NFA obtenidos a 25°C fueron $k_{cat} = 75.03 \text{ min}^{-1}$ y una $K_M = 0.13 \text{ mM}$ para la proteína EcBpIA, y para KcBpIA una $k_{cat} = 64.45 \text{ min}^{-1}$, con una $K_M = 0.37 \text{ mM}$, con eficiencias catalíticas (especificidades, k_{cat}/K_M) de 577.15 y 174.20 $\text{min}^{-1} \text{ mM}^{-1}$, respectivamente.

Las quimeras EcBpIA y KcBpIA podrían usarse para funcionalizar superficies de otros materiales, impartiendoles actividad de lipasa/esterasa, una vez lograda la interacción entre ambas quimeras.

X. Perspectivas

Optimizar el proceso de purificación para obtener un mayor grado de pureza de las quimeras.

Encontrar y mejorar métodos de concentración, para evitar la agregación de las proteínas.

Secuenciar las quimeras para asegurarnos de que el aparente cambio en peso molecular no obedece a una truncación de la enzima KcBpIA.

Estudiar las condiciones de interacción de los péptidos heterodimerizantes. Experimentar en otras condiciones, que garanticen la interacción, con la lipasa activa.

Estudiar el mecanismo de interacción. Relacionar este proceso con condiciones fisicoquímicas para tener un mayor control e incrementar su eficiencia.

Medir, por dispersión dinámica de luz (DLS), los radios hidrodinámicos de las proteínas quiméricas por separado, y luego al permitirles interactuar, para tener una aproximación de que si está ocurriendo la interacción.

XI. Bibliografía

- Aguilar S. D., Angeles S. I., Trujillo R. M., Valdez C. N. (2012). Biología sintética : diseñando sistemas biológicos con piezas genéticas. Departamento de biología molecular y biotecnología, Instituto de Investigaciones (vol. 16).
- Alcántara, S. M. P. (2009). Caracterización bioquímica de la actividad lipolítica de *Bacillus pumilus* aislado de un producto lácteo tradicional mexicano. (Tesis de licenciatura). Universidad Nacional Autónoma De México.
- Arpigny, J. L., & Jaeger, K. (1999). Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochemical Journal*. 183, 177–183.
- Benítez, M. M. T. (2009). Inmovilización De La Lipasa De *Bacillus Pumilus* GMA1 Y Actividad En Disolventes Orgánicos. (Tesis de licenciatura). Universidad Nacional Autonoma De México.
- Boyle, A. L., & Woolfson, D. N. (2012). Rational Design of Peptide-Based Biosupramolecular Systems. *Supramolecular Chemistry: From Molecules To Nanomaterials*, 1639 – 1664.
- Brzozowski, A., Derewenda, U., Derewenda, Z., Dodson, G., Lawson, D., Turkenburg, J., Bjorkling, F., Hüge-Jensen, B., Patkar, S & Thim, L. (1991). A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex. *Nature*. 351, 491–494.
- Burkhard, J., Stetefeld, J., y Strelkov, S. V. (2001). "Coiled-coil: a highly versatile protein folding motif." *Trends Cell Biology*. 11, 82-88.
- Bustos-Jaimes, I., Mora-Lugo, R., Calcagno, M., & Farrés, A. (2010). Kinetic studies of Gly28:Ser mutant form of *Bacillus pumilus* lipase: Changes in kcat and thermal dependence. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*. 1804 (12), 2222–2227.
- Camps C. V., Alonso B. C., Oliveira da S. M., Renaud M. 2011. La biología sintética. Informe conjunto del Comité de Bioética de España y del Conselho Nacional de Ética para as Ciências da Vida de Portugal. 10pp

Bibliografía

- Cardinale D., Carette N. and Michon T. (2012). Virus scaffolds as enzyme nanocarriers. *Trends in Biotechnology*. 30, 369-376.
- Cygler, M., Schrag, J. & Ergun, F. (1992). Advances in structural understanding of lipases. *Biotechnology & Genetic Engineering Reviews*. 10, 143–184.
- De Crescenzo G., Litowski J., Hodges R., and O'Connor-McCourt M. (2003). Real-Time Monitoring of the Interactions of Two-Stranded de Novo Designed Coiled-Coils: Effect of Chain Length on the Kinetic and Thermodynamic Constants of Binding. *Biochemistry*. 42, 1754-1763.
- Derewenda, U., Brzozowski A., Lawson D., Derewenda, Z. (1992). Catalysis at the interface: the anatomy of a conformational change in a triglyceride lipase. *Biochemistry*. 31, 1532–1541
- Díaz M. V. 2013. La biología sintética y sus aplicaciones. PDF obtenido de BiotechSpain. URL: <https://biotechspain.com/es/tecnica.cfm?iid=1102tecnica>
- Diener, M., Kopka, B., Pohl, M., Jaeger, K. & Krauss, U. (2016). Fusion of a Coiled-Coil Domain Facilitates the High-Level Production of Catalytically Active Enzyme Inclusion Bodies. *ChemCatChem*. 8, 142–152.
- Doukyu, N., & Ogino, H. (2010). Organic solventtolerant enzymes. *Biochemical Engineering Journal*, 48(3), 270-282.
- García T. (2012). Estudio De La Enantioselectividad De La Lipasa De *Bacillus pumilus* en Líquidos Iónicos. (Tesis de posgrado). Universidad Nacional Autónoma de México.
- Godtfredsen, S. (1990) Microbial enzymes and biotechnology. *Microbial lipases*. pp 255-274. Northern Ireland. Elsevier Applied Science.
- Grochulski, P., Li, Y., Schrag, J. & Cygler, M. (1994). Two conformational states of *Candida rugosa* lipase. *Protein Science* 3(1): 82–91.

Bibliografía

- Herrera, A. F. de J. (2014). Estudio en la enantioestabilidad de la lipasa de *Bacillus Pumilus* por mutación dirigida. (Tesis de licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México.
- Huerta, C. J. (2011). Inhibición del sistema de secreción tipo III de *Escherichia coli* enteropatógena usando péptidos coiled coil de EspA (Tesis de maestría) Instituto Politécnico Nacional.
- Jacobo M. (2015). Inmovilización de la lipasa BplA de *Bacillus pumilus*. (Tesis de Licenciatura). Instituto Tecnológico Superior de Ciudad Hidalgo.
- Jaeger, K., Dijkstra, B., & Reetz, M. (1999). Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. *Annual Review of Microbiology*. 53, 315–351.
- Janacua, V. M. E. (2014). Estudio en la función del sitio activo de la lipase de *Bacillus pumilus*. (Tesis de licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México.
- Khalil, A. S. & Collins J. J. (2010). Synthetic biology: applications come of age. *Nature Reviews Genetics*. Vol 11, 367-279.
- Kumar, A, Gross, R. (2000). *Candida Antartica* Lipase B-Catalyzed Transesterification: New Synthetic Routes to Copolyesters. *Journal of the American Chemical Society*. 122, 11767-11770.
- Likhatcheva, M. (2009). Caracterización cinética de la hidrólisis de benzil-4-nitrofenil carbonato con la lipasa recombinante de *Bacillus pumilus* GMA1. (Tesis de licenciatura). Universidad Nacional Autónoma De México.
- Lupas, A. (1996). Coiled coils: new structures and new functions. *Trends Biochemical Science*. 21, 375- 382.
- Manchester, M. & Steinmetz, N. (2009) Viruses and Nanotechnology. *Current Topics Microbiology Immunology*. 327, V-Vi.

Bibliografía

- Marsden, H. R. (2009). Coiled-Coil Self-Assembly in Synthetic Biology : Inspiration And Progress. In Extending the self-assembly of coiled-coil hybrids (pp. 2–33).
- Mason, J. & Arndt, K. (2004). Coiled Coil: Stability, Specificity, and Biological implications. *ChemBioChem*. 5,170-176.
- Mora, L. R. (2008). Propiedades catalíticas y termoestabilidad de la lipasa recombinante de *Bacillus pumilus* GMA1 (Tesis de pregrado). Universidad Nacional Autónoma de México.
- Ollis, D., Shea, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolow, F., Franken, S., Harel, M., Remington, J., Silman, I., Schrag, J. Sussman, J., Verschueren, K & Goldman, A. (1992). The α/β hydrolase fold. *Protein Engineering*. 5, 197–211
- Pérez, M. (2011). Identificación de proteínas coiled-coil específicas de plantas en el núcleoesqueleto de *Allium* cepa I. Var. Francesa. (Tesis) Universidad Complutense De Madrid.
- Rackham, O., Madera, M., Armstrong, C., Vincent, T., Woolfson, D. & Gough, J. (2010). The evolution and structure prediction of coiled coils across all genomes. *Journal of Molecular Biology*. 403, 480-493.
- Rasool, S., Johri, S., Riyaz-ul-Hassan, S., Maqbool, Q., Verma, V., Koul, S., Taneja, S. and Qazi N. (2005). “Molecular cloning of enantioselective ester hydrolase from *Bacillus pumilus* DBRL-191”. *FEMS Microbiology Letters* 249:113-120.
- Rogalska, E., Cudrey, C., Ferrato, F. & Verger, R. (1993) *Chirality* 5, 24–30
- Rose, A., Stahlberg, E., & Meier, I. (2007). Genome-wide identification and comparative analysis of coiled-coil proteins. *Surveillance of Cerebral Palsy in Europe*. 8, 167-171.
- Ruiz, J. (2011). Caracterización celular y molecular de la proteína neuroendocrina long coiled-coil 2 (NECC2) (Tesis doctoral). Universidad de Córdoba. Córdoba. Argentina.

- Santillán, U. H. S. (2012). Estudio en la Enantioestabilidad hidrolítica de la lipasa de *Bacillus pumilus*. (Tesis de licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México.
- Sarda L, Desnuelle P. (1958). Action de la lipase pancréatique sur les esters en émulsion. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* 30, 513–21
- Schrag, J., Li, Y., Cygler, M., Lang, D., Burgdorf, T., Hecht, H., Schmid, R., Schomburg, D., Rydel, T., Oliver, J., Strickland, L., Dunaway, C., Larson, S., Day, J & McPherson, A. (1997). The open conformation of a Pseudomonas lipase. *Structure* 5(2), 187–202
- Shi Y., Mowery R., Ashley J, Hentz M., Ramirez A., Bilgicer B., Slunt-Brown H., Borchelt D., Shaw B. (2012). Abnormal SDS-PAGE migration of cytosolic proteins can identify domains and mechanisms that control surfactant binding. Protein Science.
- Sharma S. & Kanwar S. (2014). Organic Solvent Tolerant Lipases and Applications. The Scientific World Journal.
- Straathof A. (2001). Development of a computer program for analysis of enzyme kinetics by progress curve fitting. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 11, 991–998.
- Uribe, H. (2012). *Estudio en la Enantioestabilidad hidrolítica de la lipasa de Bacillus pumilus* (Tesis de Posgrado). Universidad Nacional Autónoma de México. Distrito Federal. México.
- Zhou, N.E., Kay, C.M. and Hodges, R.S. (1994). The role of interhelical ionic interactions in controlling protein folding and stability. De novo designed synthetic two-stranded alpha-helical coiled-coils. *Journal of Molecular Biology.* 237, 500-512.

XII. Apéndice 1

Subclonación de los genes que codifican para las construcciones EcBplA y KcBplA en el vector de expresión pET22b(+). Los plásmidos resultantes se denominaron pET-EcBplA y pET-KcBplA.

1. Secuencias completas vs secuencia optimizada.

>KcLBpl6H optimizada para *E. Coli*

CATATGGGCAAAGTGTCCGCTCTGAAAGAAAAGGTATCTGCTCTGAAAGAAAAGGTGTCCGCACTGAAAGAGA
AAGTTTCTGCTCTGAAAGAAAAGGTTTCTGCGCTGAAAGAAGGTGGTTCTGGTGGATCCGGCGGTAGCGGTGG
TATGGCAGAACATAATCCAGTAGTAATGGTGCATGGTATTGGTGGTGTCTTCTTACAACCTTCTTCAGCATTAAAG
TCCTATCTGGTTGGCCAGGGTTGGGATCGCAACCAACTGTATGCTATTGATTTTCATTGATAAGACTGGTAACA
ACCGCAACAATGGCCCACGTCTGTCCCGTTTCGTGAAAGATGTGCTGGACAAAACCTGGTGCGAAGAAAAGTAGA
CATCGTGGCGCACTCTATGGGTGGTGCAAACACTCTGTACTACATCAAGAACCTGGATGGCGGTGACAAAATC
GAAAACGTTGTAACCATCGGTGGCGCAAACGGTCTGGTGTCTCTCGTGCGCTGCCAGGTACTGATCCAAACC
AGAAAATCCTGTACACTTCCGTGTACAGCTCTGCCGACCTGATCGTTGTAAACTCCCTGTCTCGCCTGATCGG
TGCACGTAACGTACTGATTCATGGTGTGGCCACATCGGCCTGTGACCTCTTCTCAGGTTAAAGGCTATATC
AAAGAAGGTCTGAACGGTGGCGGTCAAACACCAACCTCGAG

HMGKVSALKEKVSALKEKVSALKEKVSALKEKVSALKEGGSSGSSGSGMAEHNPFVVMVHGIGGASYNFFSIK
SYLVGQGWDRNQLYAIDFIDKTDGNRNRNNGPRLSRFVKDVLDKTGAKKVDIVAHSMGGANTLYYIKNLDGGDKI
ENVVTIGGANGLVSSRALPGTDPNQKILYTSVYSSADLIVVNSLSRLIGARNVLIHGVGHIHLLTSSQVKGYI
KEGLNNGGQNTNLE

>EcLBpl6H optimizada para *E. Coli*

CATATGGGTGAAGTTTCTGCGCTGGAGAAAGAGGTATCTGCACTGGAGAAAGAAGTATCCGCTCTGGAAAAGG
AAGTTTCCGCTCTGGAAAAGGAAGTGTCTGCCCTGGAGAAAGGTGGTTCTGGTGGATCCGGCGGTAGCGGTGG
TATGGCAGAACATAATCCAGTAGTAATGGTGCATGGTATTGGTGGTGTCTTCTTACAACCTTCTTCAGCATTAAAG
TCCTATCTGGTTGGCCAGGGTTGGGATCGCAACCAACTGTATGCTATTGATTTTCATTGATAAGACTGGTAACA
ACCGCAACAATGGCCCACGTCTGTCCCGTTTCGTGAAAGATGTGCTGGACAAAACCTGGTGCGAAGAAAAGTAGA
CATCGTGGCGCACTCTATGGGTGGTGCAAACACTCTGTACTACATCAAGAACCTGGATGGCGGTGACAAAATC
GAAAACGTTGTAACCATCGGTGGCGCAAACGGTCTGGTGTCTCTCGTGCGCTGCCAGGTACTGATCCAAACC
AGAAAATCCTGTACACTTCCGTGTACAGCTCTGCCGACCTGATCGTTGTAAACTCCCTGTCTCGCCTGATCGG

XIII. Apéndice 2

Tabla 12. Preparación de medio Luria Bertani (LB).

1 L de medio LB:	Sólido	Líquido
Triptona de caseína	10 g	10 g
Extracto de levadura	5 g	5 g
NaCl	10 g	10 g
Agar	15 g	-

Tabla 13. Preparación de gel SDS-PAGE.

Gel Separador (Concentración final 12%)		
Componente	Cantidad	
Minigeles	2	8
Tris 1 M pH 8.8	8.75 mL	26.25 mL
SDS 10%	0.22 mL	0.66 mL
Acrilamida/bis acrilamida 29.2%	8 mL	24 mL
TEMED*	27 µL	80 µL
Persulfato de amonio (PSA)* 10 %	30 µL	100 µL
Gel Concentrador		
Componente	Cantidad	
Minigeles	2	8
Agua desionizada	2.66 mL	8 ml
Tris 1 M pH 6.8	325 µL	975 µL
SDS 10%	25 µL	75 µL
Acrilamida/bis acrilamida 40%	875 µL	262.5 µL
TEMED*	10 µL	30 µL
Persulfato de amonio (PSA)* 10 %	20 µL	50 µL

Tabla 14. Mezcla desnaturalizante:

Reactivo	Cantidad
SDS 10%	2 mL
Merceptoetanol	200 μ L
EDTA 250 mM	160 μ L
Glicerol	2 mL
Tris-HCl 1M pH 6.8	1 mL
Agua	Aforar a 5 mL
Azul de bromofenol	0.1 mg

Tabla 15. Preparación del reactivo BCA pH11.3 (Likhatcheva, 2009):

Reactivo	Cantidad
BCA	5.00 g
Na ₂ CO ₃ anhidro	8.55 g
Tartrato dibásico dihidratado	0.80 g
NaOH lentejas	2.00 g
NaHCO ₃ anhidro	4.73 g
H ₂ O	Aforar a 500 mL