



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

ESTABILIDAD DE PROTEÍNAS INMOVILIZADAS EN ALMIDÓN

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA

Leticia Martínez Cruz



CIUDAD DE MEXICO.

2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: Alberto Tecante Coronel**

VOCAL: **Profesor: Carmina Montiel Pacheco**

SECRETARIO: **Profesor: Romina Ma de la Paz Rodríguez Sanoja**

1er. SUPLENTE: **Profesor: Tania Gómez Sierra**

2° SUPLENTE: **Profesor: Roeb García Arrazola**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA.

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS. UNAM

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Romina Ma de la Paz Rodríguez Sanoja

SUPERVISOR TÉCNICO:

Daniel Alejandro Guillen Santos

SUSTENTANTE:

Leticia Martínez Cruz

FINANCIAMIENTO:

Este trabajo fue financiado por el proyecto UNAM DGAPA-PAPIIT IN209316.

Contenido

1. Abreviaturas.....	1
2. Resumen	3
3. Introducción	4
4. Antecedentes.....	6
4.1 Almidón	6
4.2 α amilasa	7
4.2.1 Mecanismo catalítico	9
4.2.2. La α -amilasa de <i>L. amylovorus</i>	10
4.2.3. Reconocimiento del DFA al sustrato.....	13
4.3 Aplicaciones biotecnológicas de los dominios de unión al almidón.....	14
4.4 Autoproteólisis del DFA _{tag}	18
4.5 Inmovilización.....	19
4.6 Estabilidad y almacenamiento de proteínas.....	20
5. Justificación	22
6. Objetivo general.....	22
6.1 Objetivos particulares.....	22
7. Hipótesis	22
8. Estrategia experimental	23
9. Materiales y métodos.....	24
10. Resultados y discusión.....	29
10.1 Tc-DFA _{tag}	29
10.2 DC3M.....	37
10.3 5xA β 25-3M.....	41
10.4 Discusión general.....	46
11. Conclusiones.....	49
12. Bibliografía	50
13. Apéndice	56

1. Abreviaturas

DFA_{tag}	Dominio de unión al almidón
CBM	Módulo de unión a carbohidratos
CBM-26	Módulo de unión a carbohidratos de la familia 26
LaDC	Dominio catalítico de la α -amilasa de <i>Lactobacillus amylovorus</i>
GFP	Proteína verde fluorescente
Acr	Proteína α -cristalina de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
CR	Proteína rica en cisteínas de <i>Entamoeba histolytica</i>
Tc	Fragmento C de la toxina tetánica
Tc-DFA_{tag}	Fragmento C de la toxina tetánica fusionado con el DFA _{tag}
DC3M	Dominio catalítico fusionado con tres CBM del DFA _{tag}
5xAβ25-3M	Fragmento de A β , residuos del 11 al 25 fusionado con tres CBM del DFA _{tag}
CR-DFA_{tag}	Proteína rica en cisteínas de <i>Entamoeba histolytica</i> fusionada con el DFA _{tag}
CESH	Ácido cis-epoxisuccínico hidrolasa
Abs	Absorbancia
LB	Medio Luria Bertani
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
CP	Citrato fosfato
BL	Buffer de lisis

SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
mL	Mililitro
µL	microlitro
µg	microgramo
mA	Miliampere

2. Resumen

La estabilización de proteínas puras es un tema de interés tanto para la industria como para la investigación, ya que la mayoría de las proteínas puras son proclives a modificaciones ocasionadas por desnaturalización, agregación, degradación y proteólisis, entre otros. Numerosos esfuerzos han sido dedicados al desarrollo de métodos y soportes que mejoren la estabilidad de estas moléculas y que permitan su uso y reutilización como biocatalizadores, en la purificación de enzimas y proteínas y como parte de dispositivos para la liberación controlada de proteínas terapéuticas.

Recientemente en nuestro laboratorio se propuso el uso de un dominio de unión al almidón para la inmovilización de proteínas sobre gránulos crudos de almidón. Se demostró el uso del sistema como etiqueta para la purificación de proteína recombinante, así como el uso de las micropartículas de almidón como vehículo de vacunas orales y nasales. Derivado de estos estudios, se observó que cuando se almacena el DFA_{tag} puro, existe una degradación autoproteolítica, que es dependiente de pH, de iones divalentes y que se incrementa con el tiempo de almacenamiento y la temperatura.

Dada la degradación autoproteolítica observada en el DFA_{tag}, las aplicaciones biotecnológicas, especialmente las relativas a la vacunación, se ven limitadas ya que evidentemente las proteínas terapéuticas deben ser estables. En este proyecto de tesis se estableció un método general consistente en la inmovilización y secado de las proteínas inmovilizadas sobre almidón, que permitió el almacenamiento de las proteínas al menos hasta por 100 días a temperatura ambiente.

3. Introducción

La producción de una proteína recombinante es un proceso que implica un manejo cuidadoso de métodos, así como un adecuado control para optimizar la extracción, pureza, actividad y estabilidad de las proteínas, siendo esta última un parámetro importante para asegurar la funcionalidad y calidad de la proteína.

Una estrategia para la estabilización de proteínas es por medio de la inmovilización, donde básicamente se fija la proteína a un soporte sólido (*Rao et al., 1998*). En la cual se ha observado que las proteínas son más resistentes al efecto del pH y la temperatura (*Wang et al., 2012*). Asimismo, al estar inmovilizadas quedan protegidas ante posibles agentes desnaturizantes o proteolíticos, aumentando así la eficiencia del sistema (*Farjado et al., 2011*).

Para llevarse a cabo la inmovilización se requieren de etiquetas de afinidad que son reconocidas por su uso para la purificación de proteína recombinante. Estas etiquetas pueden ser proteínas o secuencias cortas de aminoácidos que asignan especificidad de unión a un ligando o proteína, generalmente inmovilizado en una matriz sólida (*Guillén et al., 2013*).

El utilizar módulos de unión a carbohidratos (CBM por sus siglas en inglés) como etiquetas de afinidad, es una opción para nuevos sistemas de purificación e inmovilización de proteínas recombinantes. Dentro de los CBMs se encuentran los dominios de unión al almidón, definidos como dominios proteínicos que se unen de manera específica al almidón insoluble. En el laboratorio se diseñó uno de estos dominios derivado de la secuencia de la α -amilasa de *Lactobacillus amylovorus* y nombrado DFA_{tag}. La funcionalidad de este dominio como etiqueta para la inmovilización de proteínas sobre el almidón ha sido demostrada con diferentes proteínas (*Guillén et al., 2013*). Además, la inmovilización de antígenos vía el DFA_{tag} sobre gránulos de almidón permitió usar a las micropartículas de almidón como vehículo de vacunas orales y nasales (*Moreno-Mendieta et al., 2014; Guillén et al., 2014*).

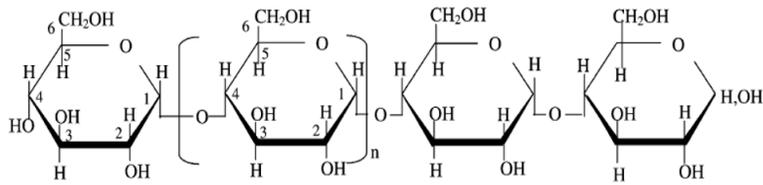
Recientemente, se observó que cuando se almacena el DFA_{tag} puro, existe una degradación autoproteolítica que es dependiente de pH, de iones divalentes, que se incrementa con el tiempo de almacenamiento y la temperatura (*Sánchez Cuapio, 2018, datos no publicados*). Este efecto de “autoproteólisis” está presente también en las proteínas utilizadas en los desarrollos mencionados.

El óptimo desarrollo de las aplicaciones biotecnológicas del DFA_{tag}, requiere mejorar la estabilidad del sistema, por lo que en este estudio se buscó desarrollar un protocolo para establecer las condiciones generales de almacenamiento que permitan alargar la vida útil de las proteínas inmovilizadas.

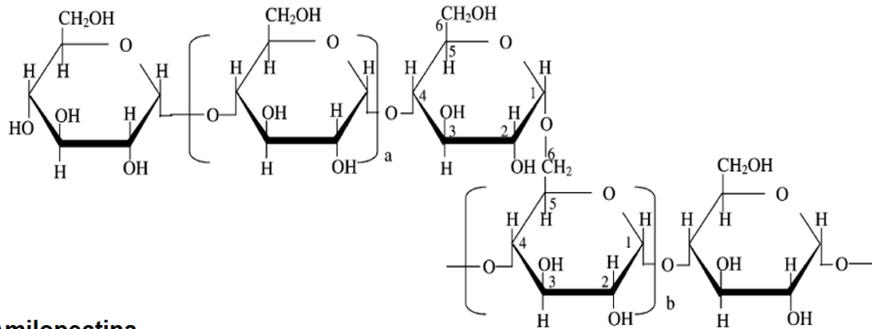
4. Antecedentes

4.1 Almidón

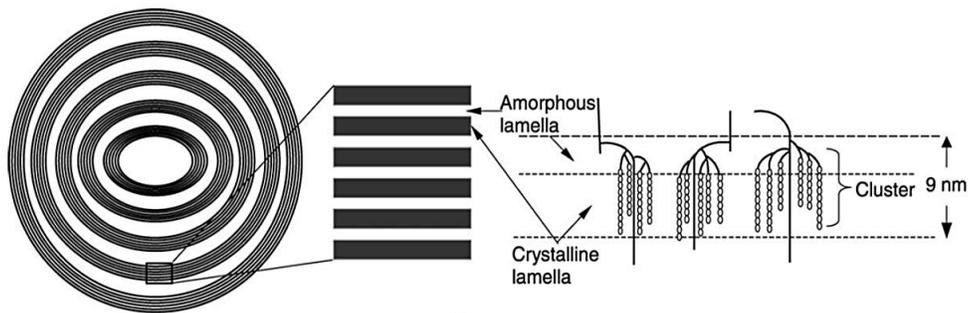
El almidón es uno de los polisacáridos más abundantes en la naturaleza, utilizado por las plantas como carbohidrato de reserva, que se localiza en semillas, frutas, tubérculos, raíces y tallos (*Raimond y Charles, 2002*). El hombre lo utiliza como fuente de energía en su alimentación y como materia prima para las industrias alimentaria, farmacéutica, textil y de biocombustibles, entre otros. Químicamente es un polímero de glucosa constituido por amilosa, cadenas de glucosa unidas por enlaces $\alpha(1,4)$ y amilopectina, que además de ser cadenas de glucosa unidas por enlaces $\alpha(1,4)$ presenta ramificaciones $\alpha(1,6)$. Ambas moléculas se organizan en capas alternas semicristalinas y amorfas formando anillos radiales de crecimiento que forman pequeños gránulos densos, variando de tamaño de 1-100 μm de diámetro, en morfología: redonda, lenticular o poligonal y en composición por el contenido de alfa-glucanos, lípidos, humedad, proteína y minerales; todo dependiendo de su origen botánico (Figura 1) (*García et al., 2012; Tester et al., 2004*).



A. Amilosa



B. Amilopectina



C. Granulo de almidón.

Figura 1. A. Estructura de la amilosa, polímero de glucosa unida por enlaces $\alpha(1-4)$. B. Estructura de la amilopectina, cadenas de glucosas unidas con enlaces $\alpha(1-4)$ y ramificaciones con enlaces $\alpha(1-6)$. C. Estructura interna del gránulo de almidón (Modificado de Tester et al., 2004).

4.2 α amilasa

La α -amilasa ($\alpha(1,4)$ glucan-4-glucanohidrolasa EC 3.2.11) es una enzima que hidroliza los enlaces $\alpha(1,4)$ en el interior del almidón y carbohidratos relacionados liberando maltooligosacáridos de diverso grado de polimerización.

El dominio catalítico de las α -amilasas está formado por varios dominios funcionales A, B y C. A es el más conservado y encontrado en todas las amilasas con una estructura tridimensional en forma de barril (β/α)₈ o barril TIM; (García et al., 2012) formado por ocho laminas- β paralelas unidas por ocho hélices- α (Figura 2) (MacGregor et al., 2001; Horvátová et al., 2001; Guillen Santos, 2005; Manterola Morales, 2015). B es un asa de longitud variable que se encuentra entre la tercera lámina- β y la tercera hélice- α del barril y junto con este forman la bolsa del sitio activo (Guillen Santos, 2005). C presenta una estructura en barril β distorsionado y se ha propuesto que estabiliza el dominio catalítico protegiendo a los residuos hidrofóbicos del dominio A (MacGregor et al., 2001). Además, en algunas amilasas, especialmente las de origen microbiano, se encuentran otros dominios no catalíticos nombrados D y E; D se desconoce la función que realiza mientras que E, se le ha asignado la función de adsorción al sustrato (MacGregor et al., 2001; Horvátová et al., 2001). En la Figura 3 se muestra la estructura que ha sido demostrada por Cristalografía de rayos X de la familia de enzimas K-amilasa (MacGregor et al., 2001).

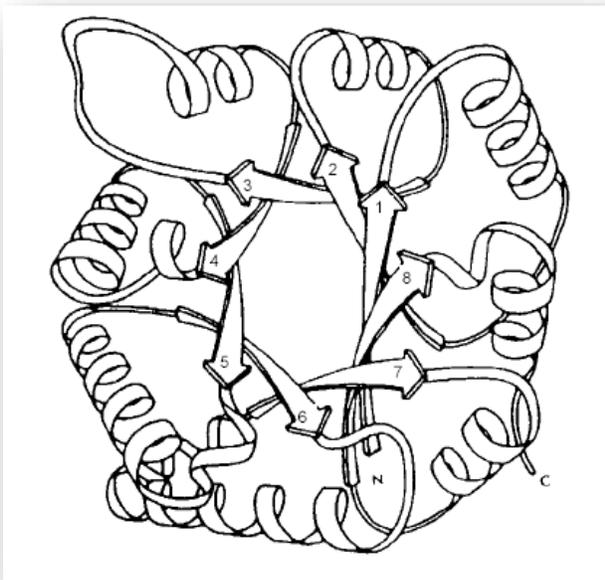
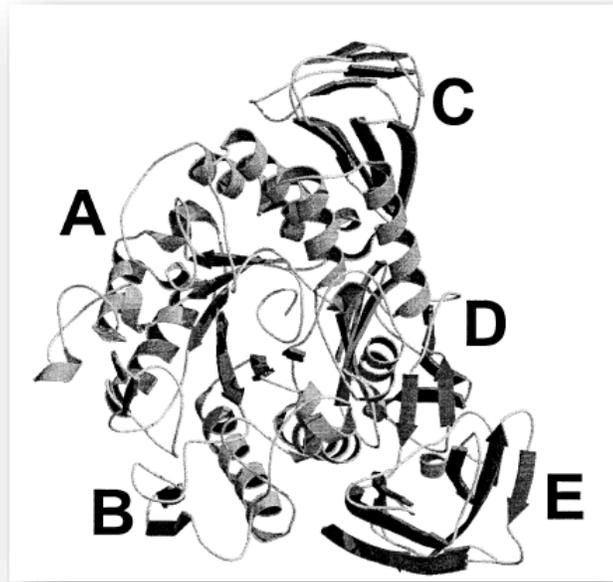


Figura 2. Ejemplo que ilustra el plegamiento clásico del barril (β/α)₈ o barril TIM, compuesto por ocho laminas- β paralelas (1-8) que forman el interior del barril rodeadas por ocho hélices- α . Existen ocho unidades (β/α) en un barril TIM regular (Horvátová et al., 2001).

Figura 3. Modelo de cinta que ilustra los dominios individuales en CGTasa; **A**, es el dominio catalítico en forma de barril (β/α)₈ o barril TIM; **B**, es un asa que sobresale de ese dominio; **C**, **D** y **E**, son dominios de láminas β -antiparalelas, donde **E** es el dominio que une al almidón.



4.2.1 Mecanismo catalítico

La familia de las α -amilasas tiene un mecanismo catalítico (Figura 4) que consiste en un doble desplazamiento involucrando dos residuos catalíticos en el sitio activo un ácido glutámico como donador y un aspartato como nucleófilo. El mecanismo consiste en cinco pasos: “(i) Una vez que el sustrato ha sido unido al sitio activo, el ácido glutámico dona un protón al oxígeno del enlace glucosídico entre los subsitios -1 y +1, mientras que el aspartato nucleofílico ataca al C1 de la glucosa en el subsitio -1. (ii) Se establece un estado de transición seguido por la formación de un intermediario covalente unido. (iii) El residuo de glucosa protonado en el subsitio +1 abandona el sitio activo, mientras que una molécula de agua (hidrólisis) o una nueva glucosa (transglucosilación) ataca la unión covalente entre la glucosa del subsitio -1 y el aspartato. (iv) Un nuevo estado de transición es formado. (v) El glutamato acepta un hidrógeno proveniente de la molécula de agua entrante o de la nueva glucosa en el subsitio +1 y el oxígeno perteneciente a la nueva molécula reemplaza la unión oxígeno-carbono existente entre la molécula de glucosa en el subsitio -1 y el aspartato, formando un nuevo grupo hidroxilo en el C1 de la glucosa del subsitio -1 (hidrólisis) o un nuevo enlace glucosídico entre las glucosas de los subsitios -1 y +1, (transglucosilación)” (Van et al., 2002; Guillen Santos, 2005; Manterola Morales, 2015).

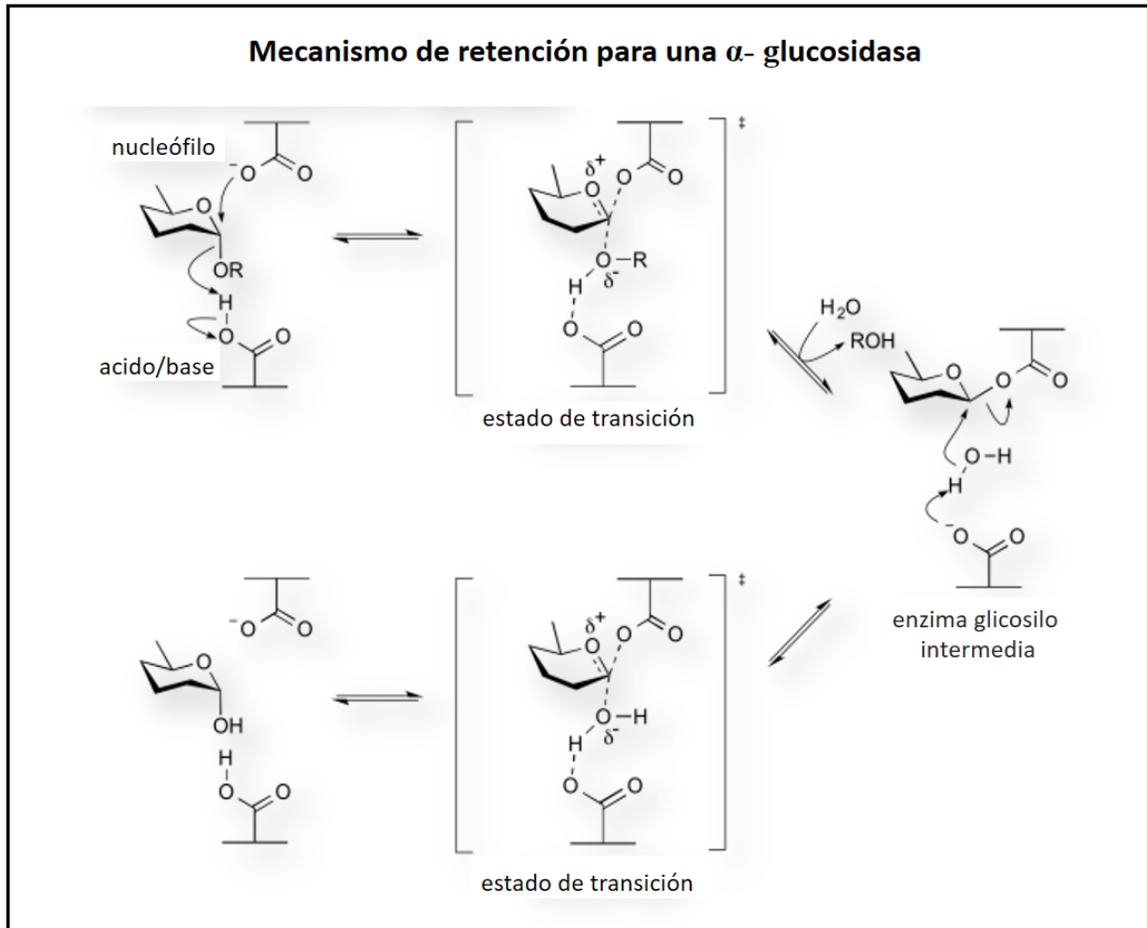


Figura 4. Mecanismo de doble desplazamiento y la formación de un intermediario covalente de la familia de las α -amilasas (tomado de CAZYPedia. Carbohydrate Active Enzymes. <http://www.cazypedia.org/index.php>).

4.2.2. La α -amilasa de *L. amylovorus*

La α -amilasa de *L. amylovorus* tiene una estructura compuesta por dos dominios funcionales: un dominio catalítico en el amino-terminal con la misma estructura tridimensional en barril TIM que comparten todas las α -amilasas y un dominio en el carboxilo-terminal constituido por cinco módulos idénticos en tándem, de 91 aminoácidos cada uno (Figura 5) (Giraud et al., 1997).

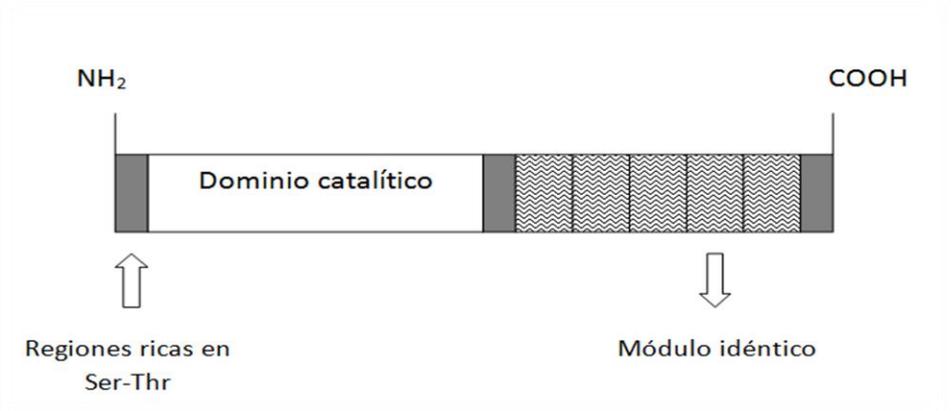


Figura 5. Representación del gen de la α -amilasa de *Lactobacillus amylovorus*.

Rodríguez-Sanoja y colaboradores estudiaron el papel funcional de las unidades en tándem del dominio carboxilo-terminal, comparando la capacidad amilolítica de sólo el dominio catalítico de la α -amilasa de *L. amylovorus* contra la actividad de la enzima completa, se comprobó que la capacidad de adsorción y degradación del almidón insoluble depende de la existencia de las secuencias en tándem del carboxilo-terminal, dando pauta al descubrimiento de un dominio funcional de fijación al almidón (Rodríguez-Sanoja et al., 2000).

Cada módulo del dominio carboxilo-terminal es un dominio funcional conocido como módulo de unión al carbohidrato (CBM), hasta el momento se sabe que estos CBMs poseen una conformación en forma de barril beta distorsionado (beta sándwich) con nueve láminas beta (García et al., 2012). Los cinco CBMs conforman el dominio conocido como de fijación al almidón (DFA) (Rodríguez-Sanoja et al., 2000; Santiago et al., 2005). En la Figura 6 se puede muestra un ejemplo de la estructura tridimensional de un DFA de CBM26 donde se observa la característica estructura compartida de barril beta (García et al., 2012). Así, el DFA se define como una secuencia de aminoácidos que es capaz de unirse al almidón, usualmente se encuentra contigua a una enzima que actúa sobre almidón o carbohidratos similares.



Figura 6. Ejemplo de la estructura tridimensional de un DFA (CBM26). El DFA se presenta interaccionando con sus correspondientes carbohidratos (en verde). Se marcan los aminoácidos esenciales para el o los sitios de unión a carbohidratos: W-rojo; T-amarillo; E-naranja; H-azul (García et al., 2012).

El DFA otorga a la enzima tres funciones principalmente, la primera es que permite la interacción entre el almidón insoluble y la enzima en solución, la segunda es que aproxima al sustrato insoluble al sitio activo del dominio catalítico de la enzima y por último en algunos casos pueden desestabilizar la superficie de los gránulos del almidón (Guiraud et al., 1997).

En un estudio previo, se evaluó el comportamiento de adsorción del DFA de la α -amilasa de *L. amylovorus* y sus versiones recortadas formadas por 1, 2, 3 y 4 CBMs (Figura 7). Se observó que cada módulo actúa de manera independiente para adsorberse al almidón y que al incrementar el número de CBMs se incrementa la afinidad por el gránulo de almidón de manera cooperativa para llevar a cabo la hidrólisis (Guillén et al., 2007). Posteriormente se demostró que tres CBMs en tándem otorgan suficiente capacidad de adsorción para habilitar la hidrólisis del almidón insoluble (Manterola Morales, 2015).

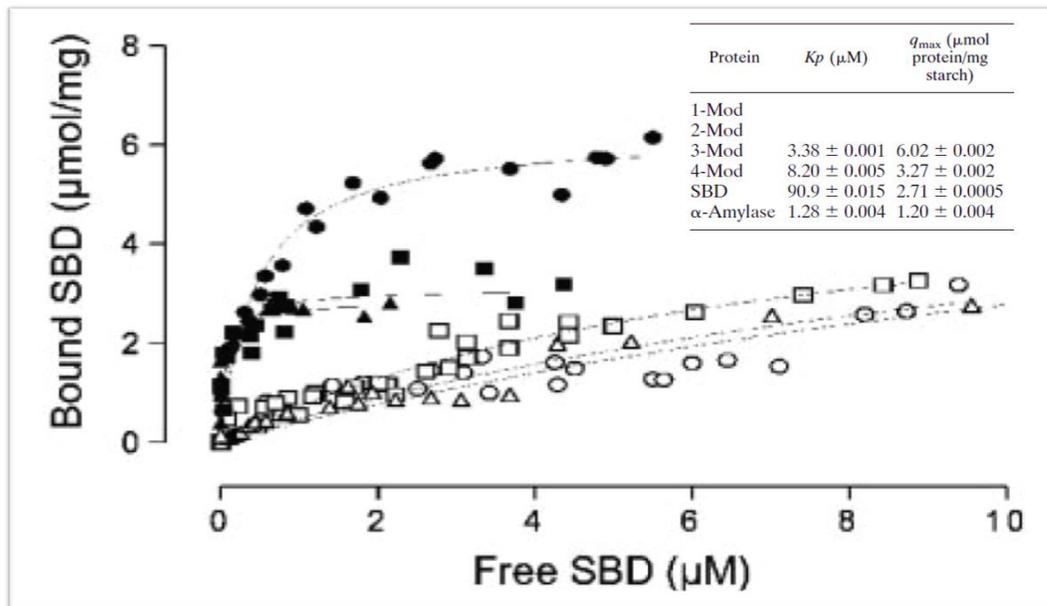


Figura 7. Isothermas de adsorción de las unidades en tándem de la α -amilasa de *L. amylovorus*. Curva de unión, considerando proteína libre después del equilibrio; \circ , 1-Mod; \square , 2-Mod; \bullet , 3-Mod; \blacksquare , 4-Mod; \blacktriangle , DFA; \triangle , α -amilasa de *L. amylovorus*. En la tabla se presentan las constantes de afinidad establecidas para cada proteína (Guillén et al., 2007).

4.2.3. Reconocimiento del DFA al sustrato

Los CBMs se encuentran clasificados dentro de la base de datos CAZY (Carbohydrate Active enZYmes) en familias de acuerdo con su estructura primaria. Los CBMs que forman el DFA de la α -amilasa de *L. amylovorus* se clasificaron dentro de la familia 26 de los módulos de unión a carbohidrato (CBM26) (www.cazy.org).

En la única estructura resuelta de esta familia (CBM26 de la α -amilasa de *Bacillus halodurans*) se observó que la interacción entre la proteína y la maltosa se da a través de interacciones hidrofóbicas de los residuos aromáticos W36 y Y25 principalmente, mientras que los residuos Y23, E77, G76 y Q71 estabilizan la unión por medio de puentes de hidrogeno (Figura 8) (Boraston et al., 2006).

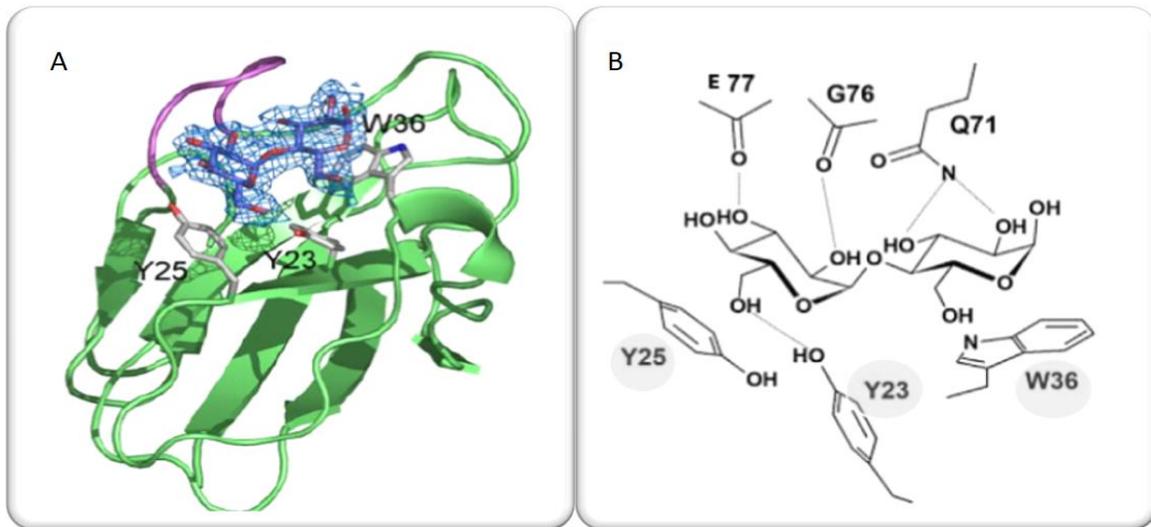


Figura 8. **A.** Mapa de densidad electrónica observada para maltosa unida a un CBM26 de α -amilasa de *B. halodurans*. Probabilidad (29) / σ_A (44), ponderado 2Fo-Fc, y contorneado en 1σ (0.14 electrones / \AA^3). En violeta un lazo de enlace móvil de un CBM26 de *B. halodurans*, las cadenas laterales de aminoácidos relevantes se muestran en una representación de "regaliz". **B.** Interacción del dominio CBM26 de la α -amilasa de *B. halodurans* con maltosa (Boraston et al., 2006).

En el caso específico de la α -amilasa de *L. amylovorus*, el DFA se unen sobre los gránulos de almidón por adsorción directa, no covalente, por medio de interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrogeno (García et al., 20012), en estudios de mutagénesis se observó que los residuos W32 y Q68 son indispensables para la unión, ya que la mutación de cualquiera de ellos elimina completamente la interacción, por otro lado, la mutación de Y18 y Y20 afecta negativamente la interacción, pero, aunque más débil se sigue dando (Rodríguez et al., 2009; Armenta et al., 2018, datos no publicados).

4.3 Aplicaciones biotecnológicas de los dominios de unión al almidón

El DFA de la α -amilasa de *L. amylovorus* fue mutagenizado para poder utilizarlo en el desarrollo de aplicaciones biomédicas y biotecnológicas. Con la proteína resultante nombrada DFA_{tag} se construyeron diferentes proteínas de fusión. Una proteína de fusión es aquella que se construye a partir de dos o más genes de proteínas independientes que son unidas para dar un solo marco de lectura y ser

traducidas para formar una sola proteína (www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionario/def/proteina-de-fusion).

Hasta el momento tres aplicaciones han sido demostradas: (a) DFA_{tag} como etiqueta de afinidad (b) DFA_{tag} para la estabilización *in vitro* de proteínas y (c) DFA_{tag} como ancla de antígenos para utilizar al almidón como vehículo de vacunas mucosales.

La principal aplicación de los DFAs está relacionada con la purificación y la inmovilización de proteínas biológicamente activas. El almidón es una atractiva matriz de purificación e inmovilización, principalmente debido a la combinación de sus propiedades físicas y bajo costo.

El DFA_{tag} se ha utilizado para la purificación de diferentes proteínas de fusión. Cuatro proteínas, el fragmento C de la toxina tetánica (Tc), la proteína verde fluorescente (GFP), la proteína α -cristalina de *Mycobacterium tuberculosis* (Acr) y la proteína rica en cisteínas de *Entamoeba histolytica* (CR) fusionadas al DFA_{tag} se lograron inmovilizar y purificar sobre gránulos de almidón de diferentes orígenes botánicos y también sobre moléculas análogas al almidón como la beta-ciclodextrina, donde sorprendentemente, se obtuvo una mejor purificación con este sistema que con el sistema comercial His-tag (Etiqueta de histidinas). La Figura 9 ilustra algunas de estas purificaciones (Guillen et al., 2013).

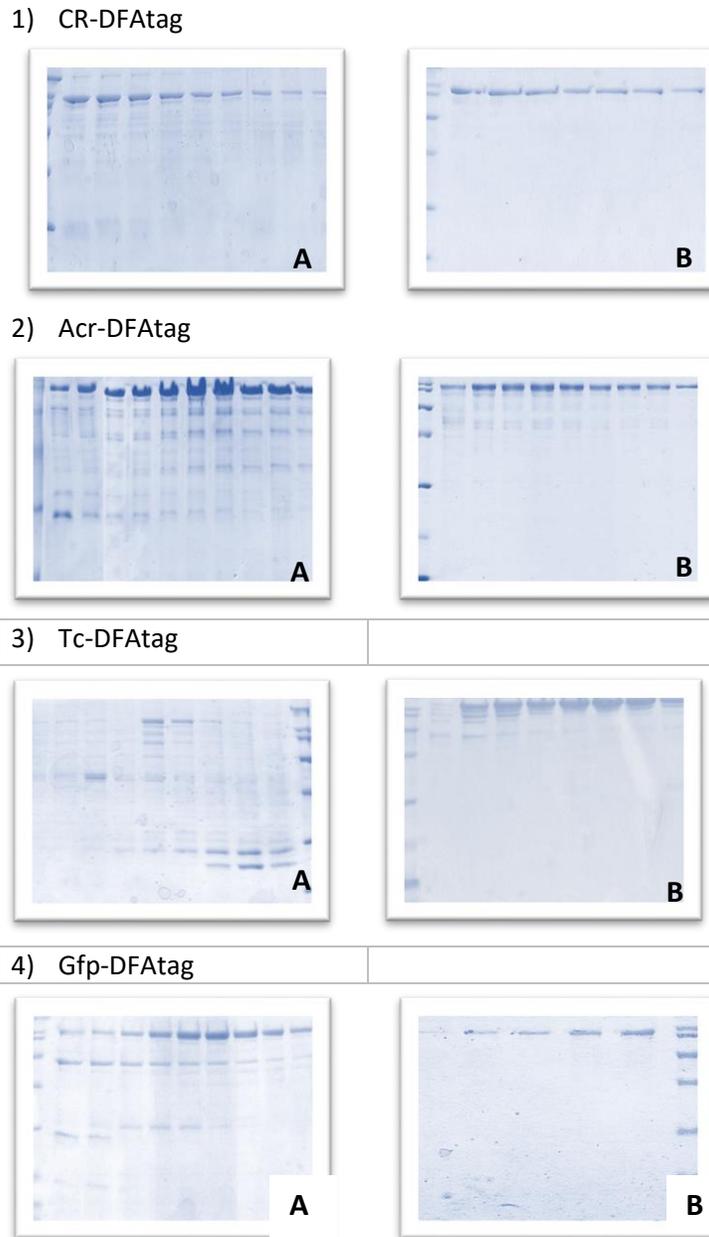


Figura 9. SDS-PAGE mostrando las proteínas de fusión purificadas en FPLC con A) Sistema His-tag en columna comercial His-Trap HP (GE Life Sciences) y B); Sistema DFA_{tag} en una columna de β -ciclodextrina (análogo del almidón) (Guillen *et al.*, 2013).

En estudios posteriores se observó que las proteínas de fusión inmovilizadas en almidón, vía el DFA_{tag} mostraban mayor estabilidad en condiciones simuladas de fluido gástrico (pepsina 3.2 mg/mL (w/v), 30 mM NaCl, 86 mM HCl, pH 1.2) e intestinal (pancreatina 10 mg/mL (w/v), 0.05 M KH₂PO₄, 0.2 N NaOH, pH 7.5), la

pancreatina contiene tripsina, quimotripsina y carboxipeptidasa (Moreno-Mendieta, 2014; Guillén Santos, 2015).

En la Figura 10 se muestran dos proteínas de fusión que fueron expuestas a estas condiciones, la primera es la proteína de fusión CRDFA_{tag} y la segunda TcDFA_{tag}, como se puede observar en ambos casos la proteína que se encuentra libre (no inmovilizada) se degrada más rápido con respecto a la misma proteína que se encuentra inmovilizada sobre el gránulo de almidón.

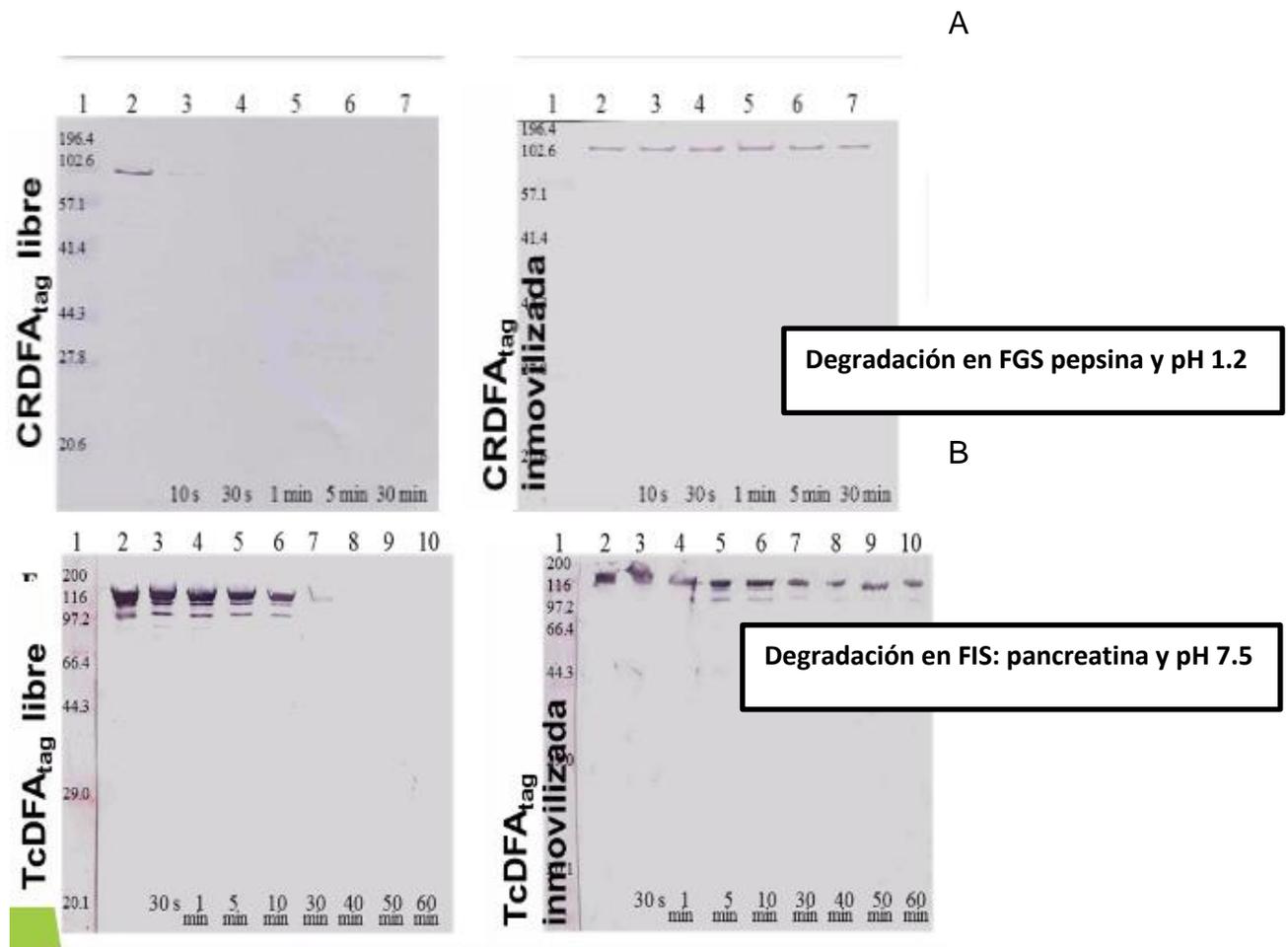


Figura 10. Degradación de (A) la proteína rica en cisteínas de *Entamoeba histolytica* fusionada al DFA_{tag}, en fluido gástrico simulado (FGS) y (B) el fragmento C de la toxina tetánica fusionada al DFA_{tag} incubada en fluido intestinal simulado (FIS). Carriles: 1) marcador de masa molar, 2) Proteínas incubadas en la solución tampón sin enzimas 37°C, 30 min; carriles 3-10 proteínas incubadas en FGS o FIS a 37°C por los periodos de tiempo indicados en la parte inferior de los geles. (Moreno-Mendieta, et al., 2014).

Derivado de la segunda aplicación, se probó la funcionalidad del sistema como vehículo para la administración de antígenos vía mucosas. El fragmento C de la toxina tetánica fusionado con el DFA_{tag} (Tc-DFA_{tag}) inmovilizado en gránulos de almidón, se administró por vía oral a ratones sanos sin el uso de ningún adyuvante. Los resultados observados mostraron que el sistema permitía la inducción de anticuerpos específicos contra el antígeno de interés y más aún la proteína inmovilizada retrasó la aparición de síntomas de tétanos cuando los ratones fueron retados con la toxina. Estos resultados en su conjunto demostraron la viabilidad del sistema para ser utilizado como portador de antígenos para vacunas orales (Guillen et al., 2014).

Posteriormente el sistema fue probado con proteína Acr de *Mycobacterium tuberculosis*, administrada por vía oral e intranasal. La caracterización de la respuesta mostró que la inmovilización de los antígenos permitió la producción de anticuerpos sistémicos predominantemente de tipo IgG2a, además de la secreción de interferón γ , lo que demuestra el potencial del sistema como un nuevo adyuvante (Moreno-Mendieta et al., 2014).

4.4 Autoproteólisis del DFA_{tag}

Recientemente se ha observado que el DFA_{tag} cuando se almacena puro, por largos periodos de tiempo, sufre una hidrólisis que no corresponde a una degradación al azar. Esta degradación se presenta también en las proteínas de fusión descritas anteriormente.

Sánchez Cuapio concluyó que cuando se almacena el DFA_{tag} puro, existe una degradación autoproteolítica (fenómeno de naturaleza autocatalítica tanto en presencia o ausencia del dominio catalítico), que es dependiente de pH, de iones divalentes y que se incrementa con el tiempo de almacenamiento y la temperatura (Sánchez Cuapio, 2018, *datos no publicados*). En la Figura 11 A se muestra la hidrólisis que sufre el DFA_{tag} al almacenarse durante tres semanas a 4 °C. En la Figura 11 B se muestra la incubación con Tris-HCL a pH 7.2, temperatura ambiente por 72 h y el efecto que cationes como Mg²⁺, Ca²⁺ y Zn²⁺ tienen en la velocidad de proteólisis del DFA_{tag}.

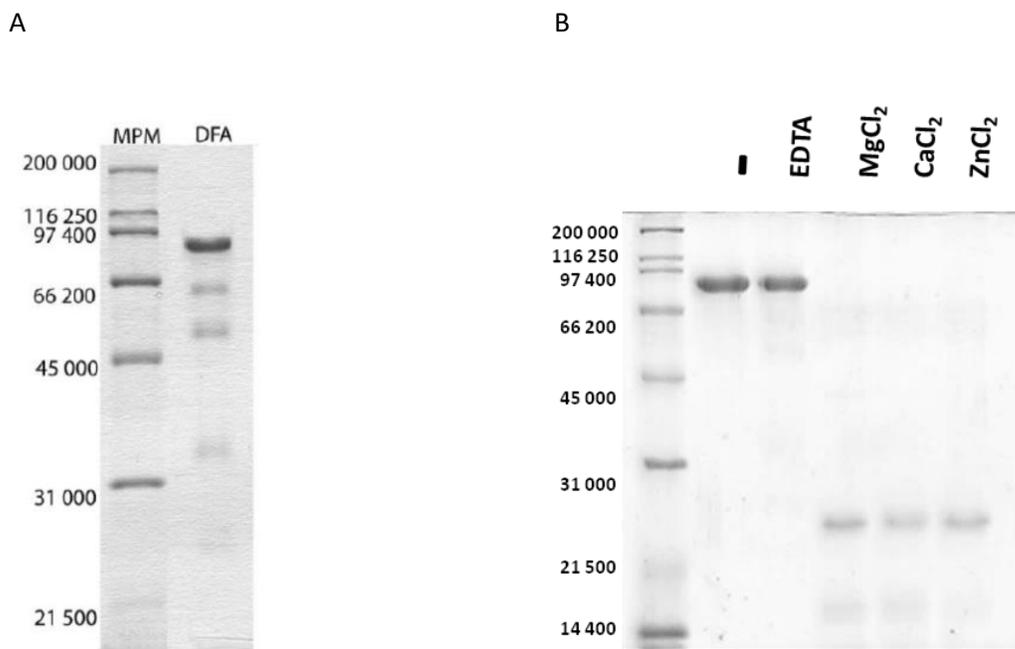


Figura 11. A) SDS-PAGE que muestra DFA_{tag} incubado en amortiguador fosfatos 20 mM pH 7.6 a 4 °C durante tres semanas. B) DFA_{tag} incubado a 37 °C en tampón Tris-HCl 0.05 M pH 7.2 por 72 h. Carriles: 1) Marcador de masa molar, 2) DFA_{tag} incubado en las condiciones mencionadas, 3) Con EDTA 20 mM 4) En presencia de MnCl₂ 2 mM, 5) En presencia de CaCl₂ 2 mM 6) En presencia de ZnCl₂ 2 mM (Sánchez Cuapio, 2018, datos no publicados)

Dada la degradación autoproteolítica observada en el DFA_{tag}, las aplicaciones biotecnológicas, especialmente las relativas a la vacunación, son vulnerables y dependen en gran medida de la estabilidad del sistema. En este trabajo se buscó desarrollar un método que permita establecer las condiciones generales de almacenamiento donde se pueda alargar la vida útil de las proteínas de fusión inmovilizadas con el DFA_{tag}.

4.5 Inmovilización

La inmovilización de una proteína consiste básicamente en fijar la proteína a un soporte sólido dando como resultado la pérdida parcial o total de movimiento (Rao *et al.*, 1998), lo que resulta en la protección frente a posibles agentes desnaturizantes (calor, detergentes, disolventes orgánicos, pH, fuerza iónica) o proteolíticos (peptidasas y proteasas como tripsina, quimotripsina o

carboxipeptidasas). También adquiere ventajas en contraparte con la proteína en disolución, ya que permite el uso continuo, la reutilización de la proteína y el control de las concentraciones empleadas. Teóricamente sería entonces viable mejorar la estabilidad de las proteínas fusionadas e inmovilizadas en almidón de tal manera que se aumente la eficiencia del sistema (*Farjado et al., 2011, Es et al., 2015*).

4.6 Estabilidad y almacenamiento de proteínas

La estabilidad está vinculada con el concepto de *vida útil*, que en términos generales significa el periodo de tiempo durante el cual resulta deseable la utilización de un producto. Los factores que afectan durante el almacenamiento pueden ser intrínsecos (pH, sistemas enzimáticos, carga microbiana, principalmente) o ambientales (temperatura, humedad, presión, luz, entre otros) y estos pueden incidir de modo negativo sobre la estabilidad de un producto almacenado (*Gutiérrez 2000*). Puede ser complicado establecer un método que permita asegurar que un producto tenga una vida útil a largo plazo y que además sea aceptable desde el punto de vista de la bioseguridad.

De manera general, las proteínas para ser almacenadas se deben mantener a temperaturas entre de 4 °C o a -20 °C, para evitar reacciones de degradación, esto implica altos costos porque se debe mantener una cadena de frío constante. Recientemente se propuso en la India una vacuna contra rotavirus ROTASIL®[®], esta vacuna mantiene sus propiedades a 37 °C por al menos treinta días, por lo que simplifica su distribución, almacenamiento y transporte. Para lograr la estabilidad de la vacuna se llevó a cabo un proceso de liofilización, ya que observan que la humedad tiene impacto en la estabilidad de la vacuna y al reducir la movilidad de las moléculas pueden impedir reacciones de agregación o aglutinación, además, después de llevarse a cabo la liofilización y disminuir la humedad residual por debajo del 3 %, se reduce el riesgo de reacciones químicas indeseables como la hidrólisis, la oxidación, la desaminación, la precipitación (*Sameer et al., 2017*).

Se ha expuesto en algunas investigaciones, que la inmovilización de proteínas con los CBMs conduce a una mejora de propiedades enzimáticas que son importantes en la industria (*Oliveira et al., 2015*). Un ejemplo es la hidrolasa del ácido cis-

epoxisuccínico (CESH) que es utilizada para la producción de ácido tartárico, sin embargo, la enzima es inestable por lo que sus aplicaciones se ven limitadas. Wang y colaboradores (2012) probaron la fusión de cinco diferentes CBMs a la CESH e inmovilizaron las enzimas quiméricas sobre celulosa. Los autores observaron mayor eficiencia catalítica e incrementaron la estabilidad de la enzima a pH y temperatura, aunque no analizaron si la enzima alargaba su vida útil (*Wang et al., 2012*).

5. Justificación

La estabilidad del sistema DFA_{tag} en las fusiones es de vital importancia para poder explotar sus aplicaciones biotecnológicas y biomédicas; por lo que es necesario un método con condiciones generales que permita estabilizar y alargar la vida útil de las proteínas fusionadas e inmovilizadas en los gránulos de almidón.

6. Objetivo general

Establecer un método general de almacenamiento para proteínas fusionadas con el sistema DFA_{tag} para limitar su autoproteólisis.

6.1 Objetivos particulares

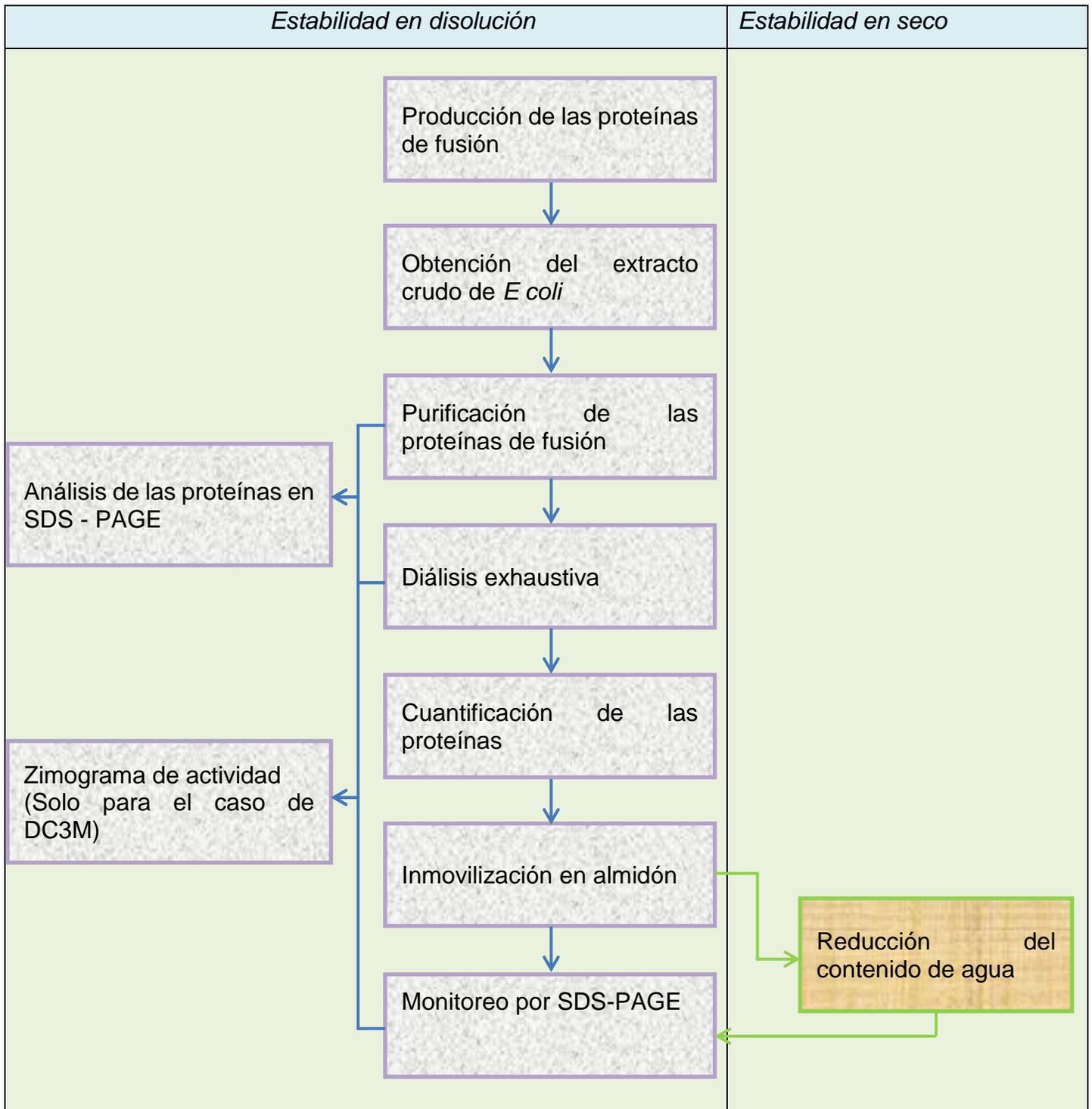
- ☞ Analizar el fragmento C de la toxina tetánica (Tc) fusionada con el DFA_{tag} cuando se encuentra inmovilizado sobre almidón y en disolución.
- ☞ Analizar el efecto del almacenamiento en seco sobre la estabilidad del fragmento C de la toxina tetánica (Tc) fusionada con el DFA_{tag} inmovilizado sobre almidón.
- ☞ Seleccionar el método de almacenamiento que limitó la autoproteólisis del fragmento C de la toxina tetánica (Tc) fusionada con el DFA_{tag}.
- ☞ Evaluar si las condiciones de almacenamiento seleccionadas para el fragmento C de la toxina tetánica (Tc) fusionada con el DFA_{tag} aplican para otras proteínas.



7. Hipótesis

La inmovilización de proteínas en el almidón favorece la estabilidad de las proteínas de fusión con respecto a las proteínas que se encuentran en disolución, ya que su movilidad será restringida por el soporte. Además, el secado reduce el contenido de agua del sistema, lo que limita la hidrólisis, aumentando la estabilidad de la proteína almacenada.

8. Estrategia experimental



9. Materiales y métodos

Proteínas de fusión

Para las pruebas de estabilidad se seleccionaron tres proteínas, el fragmento C de la toxina tetánica fusionado con el DFA_{tag}, el dominio catalítico de la α -amilasa de *Lactobacillus amylovorus*, fusionado con tres CBMs del DFA_{tag}, y un fragmento del péptido β amiloide fusionado igualmente con tres CBMs.

- Fragmento C de la toxina del tétanos con el DFA_{tag}. (Tc-DFA_{tag})

El gen codifica una proteína de fusión (Tc-DFA_{tag}) de 962 aminoácidos, con de 107.8 kDa, un punto isoeléctrico de 5.19 con un coeficiente de extinción de 192660 1/M * 1/cm a 280 nm, Abs 0.1 % (1= g/L) 1.787 (ProtParamTool, ExPASy). La proteína se expresó en *E. coli* BL21 transformada con el plásmido pQE31- TcDFA_{tag} (Aguilera Ruiz, 2012).

Esta proteína se purificada de manera eficiente sobre gránulos de almidón (Guillén et al., 2013), y fue con esta misma proteína que se demostró la capacidad del sistema para inmovilizar antígenos sobre almidón para su uso como vacuna oral (Guillén et al., 2014).

- Dominio catalítico de la α -amilasa de *Lactobacillus amylovorus* con tres módulos del DFA_{tag} (DC3M)

El gen codifica una proteína de fusión DC3M que tiene 819 aminoácidos, con una masa molar de 90.4 kDa, un punto isoeléctrico de 5.1 y un coeficiente de extinción de 167 540 1/M * 1/cm a 280 nm, Abs 0.1 % (1= g/L) 1.853 (ProtParamTool, ExPASy). Esta proteína se expresó en *E. coli* BL21 transformada con el plásmido PET15DC3UR (Manterola Morales, 2015).

Esta proteína se seleccionó para poder seguir la actividad enzimática de la amilasa durante el almacenamiento. A pesar de tener solo tres CBMs no existen diferencias significativas para la adsorción al almidón en referencia a la amilasa completa que contiene los cinco CBMs (Manterola Morales, 2015).

- Fragmento 11-25 del péptido β -amiloide en tándem (5X) con tres módulos del DFA_{tag} (5xA β 25-3M)

El gen codifica una proteína de fusión de 425 aminoácidos, con una masa molar de 47.2 kDa, un punto isoeléctrico de 5.1 y un coeficiente de extinción de 62 800 1/M * 1/cm a 280 nm, Abs 0.1 % (1= g/L) 1.33 (ProtParamTool, Expasy). Esta proteína se expresó en *E. coli* DH5 α transformada con el plásmido pETDFAmut- 5xA β 25 (Vasquez Martínez, 2017).

El péptido β -amiloide (A β) se encuentra implicado en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer. Este péptido es anfifílico con un núcleo central y doce residuos muy hidrofóbicos, tiende a formar agregados debido a la formación de fibrillas (Vasquez Martínez, 2017), esta condición lo vuelve muy difícil de trabajar *in vitro*, y es esta también la condición por la que seleccionamos el péptido, como una prueba límite para el sistema.

9.1 Producción de las proteínas de fusión

Para la producción, las bacterias se hacen crecer en medio Luria-Bertani (LB) con ampicilina (100 μ g/mL). El cultivo se reactivó a partir de glicerol, se inocula al 1 % en 10 mL de LB y se incuba a 37 °C por 24 h. Transcurrido el tiempo la bacteria se inoculó al 1 % en 2-5 L de medio LB-Amp y se incuba por 12 h a 29 °C, al cabo de las cuales se indujo la transcripción del gen que codifica para cada proteína recombinante con IPTG (Isopropil- β -D-1-tiogalactopiránosido) 0.1 mM y se incubó por 4 h más a la misma temperatura.

Las células se cosecharon por centrifugación a 8 000 rpm durante 10 min a 4 °C. El botón celular obtenido se lavó con 50 mL de buffer citrato-fosfato (CP) 25 mM al pH correspondiente para las pruebas que se realizaron con cada proteína (Tabla 1) y se centrifugó a 9 000 rpm durante 15 min a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y el botón se guardó a -20 °C hasta su uso.

Tabla 1. Condiciones probadas en la purificación de las proteínas recombinantes

	Tc-DFA_{tag}	DC3M	5xAbβ25-3M
pH	4, 5, 6 y 7	5 y 7	6.5 y 7

9.2 Extracción de la proteína

El botón celular cosechado se resuspendió en una fracción de 1/200 el volumen del cultivo de buffer de lisis, citrato-fosfato 25 mM, con inhibidor de proteasas de uso general Sigma (1:500), tritón al 2 %, y maltosa 10 mM (BL) al pH correspondiente. Ya que la bacteria tiene la proteína localizada intracelularmente se lisó por sonicación. Para ello se realizaron tres pulsos de 60 Hz por 10 s dejando reposar 1 min entre cada pulso. El lisado se centrifugó a 4 °C durante 15 min a 13 000 rpm y se separó el sobrenadante. El botón celular se resuspendió nuevamente en 1/200 BL y se sónico con tres pulsos de 60 Hz por 20 s de duración, enfriando la muestra en hielo entre cada pulso. Al finalizar, se mezcló el nuevo lisado con el sobrenadante anterior; en el caso específico de la proteína 5xAb β 25-3M también se añadió NaCl 100 mM, y EDTA 10 mM. La mezcla se agitó ligeramente por 20 min a 4 °C. Posteriormente se centrifugó la muestra por 20 min a 15 000 rpm y se recuperó el sobrenadante que está listo para incubarse con el almidón.

Para la purificación, se utilizó almidón de maíz insoluble lavado a temperatura ambiente dos veces por 10 min con 10 volúmenes (m/v) de agua destilada estéril y una vez con buffer CP al pH al cual se realizó la purificación. El almidón se recuperó de cada lavado centrifugando por 3 min a 5 000 rpm. Como se trabajó a pH diferentes, se separó el almidón para realizar la incubación con el lisado a pH 4, 5, 6 y 7.

9.3 Purificación con almidón

La purificación se llevó a cabo a partir del lisado que contiene la proteína recombinante, utilizando como matriz de afinidad almidón insoluble de maíz. El lisado obtenido (10 mL) se incubó con el almidón (50 mg de almidón/mL de lisado),

al pH correspondiente durante 2 h, en agitación ligera a 4 °C. Pasado el tiempo de incubación se centrifugó a 5 000 rpm durante 5 min a 4 °C. Separando el sobrenadante y recuperando el almidón. El almidón recuperado de cada tubo se lavó con 40 mL de sus respectivos buffers durante 10 min, centrifugando 5 min a 5 000 rpm a 4 °C. El paso del lavado se repitió cinco veces.

La proteína de fusión de cada pH se eluye con beta-ciclodextrina 8 mM o maltosa 0.1 M (en el caso del DC3M para evitar inhibición) según la proteína de fusión. Se dejó el almidón lavando con la solución de elución 5 min y se centrifuga 5 min a 5 000 rpm. El paso de elución se repitió dos veces más. Las eluciones se vieron en un SDS-PAGE (Apéndice II) para verificar la presencia de la proteína.

9.4 Diálisis

Antes de comenzar la diálisis, las membranas de celulosa (Spectra/por®Dialysis Membrane, Pre-wetted RC Tubing, MWCO: 25 kDa) fueron lavadas tres veces en 50 mL de agua y posteriormente dos veces con 50 mL del buffer a probar. La diálisis se realizó exhaustivamente contra buffer CP al pH establecido para cada proteína (16 h con mil veces el volumen de la muestra, con un cambio de buffer después de 12 h). Posteriormente, el estado de las proteínas de fusión se verificó nuevamente en SDS-PAGE y en el caso de la proteína de fusión DC3M se realiza también un zimograma con yodo yoduro. Estas muestras fueron marcadas como el tiempo cero del seguimiento.

9.5 Cuantificación de proteína

La proteína se cuantificó por adsorción a 280 nm, utilizando el coeficiente de extinción de cada proteína de fusión.

Utilizando la ecuación:

$$\text{Concentración } \left(\frac{g}{L}\right) = \left(\frac{\text{adsorbancia } 280 \text{ nm}}{1 \text{ cm} \times \text{coeficiente de extinción } \left(\frac{1}{\text{mol}} \times \frac{1}{\text{cm}}\right)} \right) \times \text{masa molar } \left(\frac{g}{\text{mol}}\right)$$

9.6 Inmovilización

La inmovilización se llevó a cabo en almidón de arroz previamente estéril, se lavó con el respectivo tampón CP al pH a utilizar, en una proporción 1:100 m/m. La inmovilización se realizó por duplicado para cada pH y cada tiempo a muestrear (1, 3, 6, 10, 15, 20, 30, 45 y 60 días). En el caso del Tc-DFA_{tag} se inmovilizaron 4 µg de proteína y para las otras dos proteínas, DC3M y 5xAβ25-3M, 5 µg. Además, para DC3M se consideraron otras dos muestras para realizar los zimogramas (Apéndice IV).

9.7 Disminución del agua presente en la proteína inmovilizada

Para secar la proteína de fusión. Cada tubo que contiene a la proteína inmovilizada se centrifugó 3 min a 13000 rpm, separando el sobrenadante y dejando solo el pellet de almidón con la proteína adsorbida. Al pellet de almidón se lavó dos veces, el primero con 12.5 µL / µg de proteína con etanol al 50 % agitando suavemente durante 5 min, y el segundo con 12.5 µL / µg de proteína de etanol absoluto, en cada lavado se centrifugó 1 min a 13000 rpm, eliminando el etanol, se dejó secar en condiciones estériles por medio de una campana de flujo laminar por 2 h para evaporar por completo al etanol.

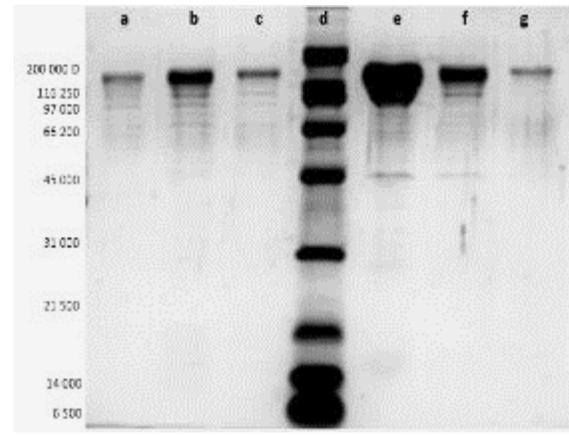
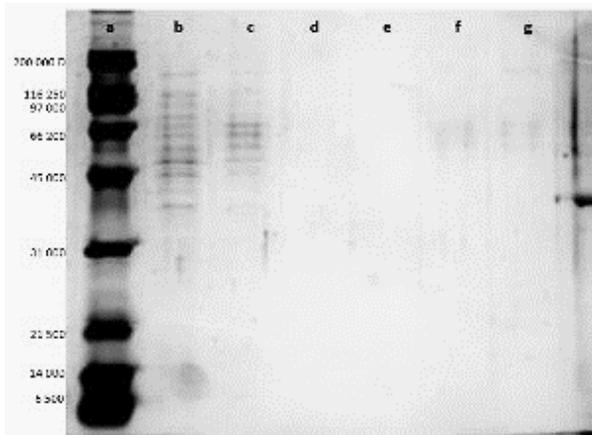
9.8 Monitoreo

Por último, se monitoreo cualitativamente la estabilización de la proteína inmovilizada por medio de geles SDS-PAGE comparando con la proteína de fusión en disolución (para DC3M se realizó un zimograma yodo/yoduro para verificar la presencia de actividad durante el almacenamiento). La gelatinización del almidón es indeseable para cargar las muestras, es por eso por lo que, para evitar la gelatinización, las muestras con almidón se hirvieron solo por 1 min y se dejaron enfriar a temperatura ambiente antes de ser cargadas. La proteína libre se hirvió a 96 °C por 5 min y se enfrió a 4 °C.

10. Resultados y discusión

10.1 Tc-DFA_{tag}

La proteína purificada a los diferentes pH se analizó en SDS- PAGE (Figura 12), se observa que las bandas de las eluciones de proteína de fusión Tc-DFA_{tag}, a pH 4 y 5, no se distinguen, por lo que se cree que a esos pH la proteína pudo haberse degradado o precipitado durante el proceso de purificación. Mientras que para los pH 6 y 7 se ven las bandas muy fácilmente, sin embargo, el pH 7 es el más adecuado para la purificación. El comportamiento observado en esta proteína resulta muy interesante y contrastante con lo observado en el DFA_{tag} cuando no se encuentra fusionado a ninguna proteína, ya que este es mucho más estable a pH 5 y muy inestable a pH mayores de 7.



I

II

Figura 12. SDS-PAGE, que muestra las eluciones de Tc-DFA_{tag} después de la purificación a diferente pH. **I a.** Marcador de masa molar (Broad-Range Bio-Rad) **b, c y d.** Tc-DFA_{tag} a pH 4 eluciones 1, 2 y 3 **e, f y g.** Tc-DFA_{tag} a pH 5 eluciones 1, 2 y 3. **II a, b y c.** Tc-DFA_{tag} a pH 6 eluciones 1, 2 y 3 **d.** Marcador masa molar (Broad-Range Bio-Rad), **e, f y g.** Tc-DFA_{tag} a pH 7 eluciones 1, 2 y 3.

Por otro lado, en los geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) se observa que la proteína de fusión (Tc-DFA_{tag}), migra por arriba de la masa molecular calculada, este fenómeno se ha observado en el laboratorio en todas las proteínas que incluyen en su secuencia dominios de interacción con carbohidratos.

La proteína obtenida se dializó y cuantificó (Tabla 2), comprobándose la baja concentración de proteína a pH 4 y 5, y el doble de recuperación a pH 7 sobre pH 6.

Tabla 2. Cuantificación de Tc-DFA_{tag} después de la diálisis de Tc-DFA_{tag}, a diferente pH.

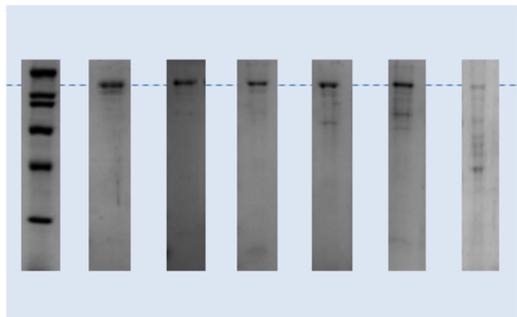
pH del buffer	4	5	6	7
Absorbancia	0.106	0.104	0.51	1.02
Concentración Tc-DFA _{tag} (µg /mL)	58	57	280	570

La inmovilización de la proteína sobre el almidón se llevó a cabo en una relación 1:100 proteína: almidón (Apéndice III) a pH 6 y 7. La proteína se almacenó a 4 °C temperatura que se utiliza normalmente para conservar péptidos y proteínas y a 37 °C para probar una temperatura ambiental “extrema”. La evaluación de estabilidad se realizó en los días, 1, 3, 6, 10, 15, 20, 30, 45 y 60.

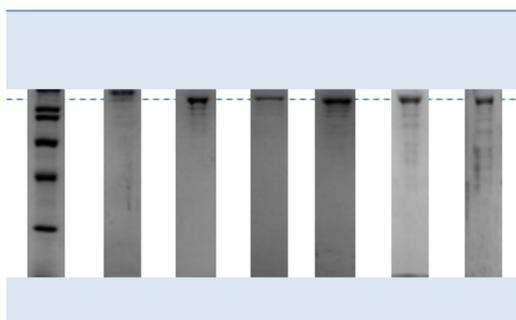
A pH 6 y temperatura de 4 °C, no se observan algún cambio en la intensidad de las bandas de la proteína Tc-DFA_{tag}, sea que permanezca inmovilizada o en disolución, al menos hasta el día 30. Después de ese día la proteína muestra degradación importante. Mientras que, a temperatura de 37 °C, se observa que la proteína de fusión inmovilizada es menos estable, ya que presenta degradación a partir del día 20 y prácticamente desaparece al día 30, en contraparte de la proteína libre que comienza a degradarse a partir del día 20 pero permanece durante todo el monitoreo (Figura 13).

pH 6 (4°C) Inmovilizada

MPM Día 0 Día 10 Día 20 Día 30 Día 45 Día 60

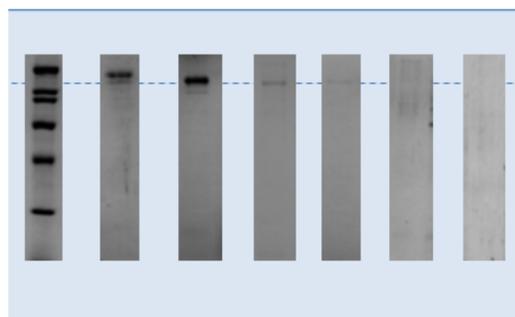


pH 6 (4°C) libre



pH 6 (37°C) Inmovilizada

MPM Día 0 Día 10 Día 20 Día 30 Día 45 Día 60



pH 6 (37°C) libre

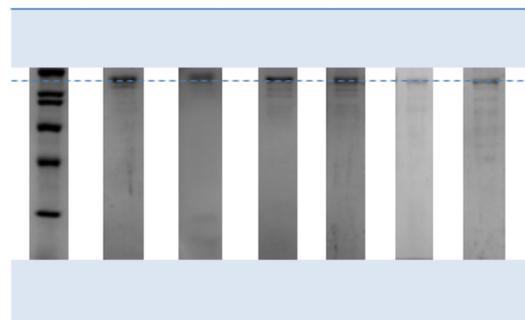


Figura 13. Seguimiento de la proteína Tc-DFA_{tag} a pH 6 temperatura 4 °C, inmovilizada (superior izquierdo) y libre (inferior izquierdo); Tc-DFA_{tag} a pH 6 temperatura 37 °C, inmovilizada (superior derecho) y libre (inferior derecho).

De manera semejante a lo observado a pH 6, a pH 7 tanto la Tc-DFA_{tag} inmovilizada como en disolución, permanecen estables hasta los 30 días, sin diferencias entre la temperatura de almacenamiento. En el día 45 ya se observan diferencias importantes con respecto a la inmovilización. Contrario a lo esperado, la proteína inmovilizada se degrada más rápidamente que la proteína en disolución tanto a 4 °C como a 37 °C y al día 60 prácticamente ha desaparecido (figura 14).

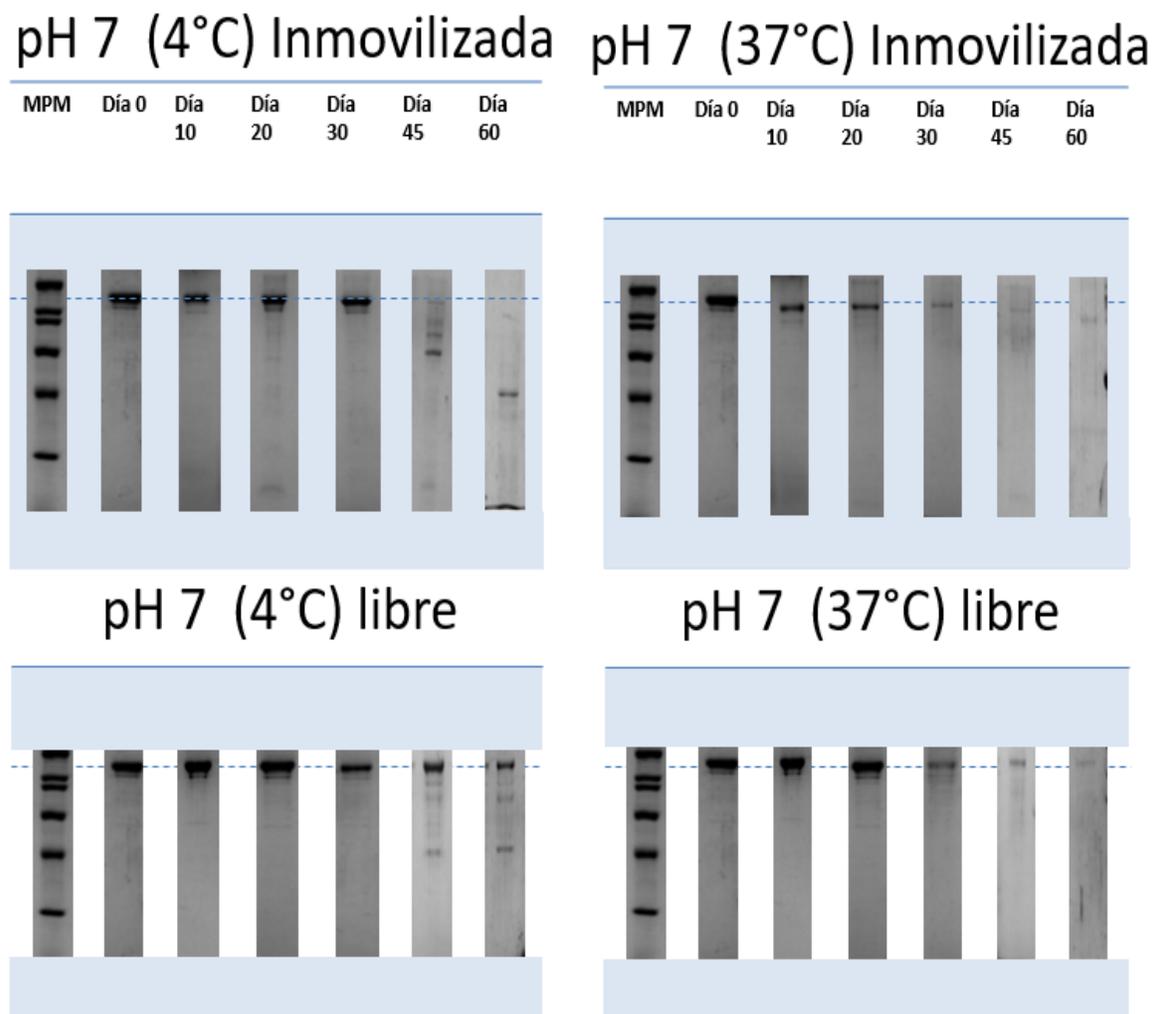


Figura 14. Seguimiento de la proteína Tc-DFA_{tag} a pH 7 temperatura 4°C, inmovilizada (superior izquierdo) y libre (inferior izquierdo); Tc-DFA_{tag} a pH 7 temperatura 37°C, inmovilizada (superior derecho) y libre (inferior derecho).

Lo que ocurre a este pH a sus diferentes temperaturas para la proteína de fusión Tc-DFA_{tag} que se encontraba inmovilizada en el almidón, no fue lo esperado ya que la inmovilización tiene un efecto no deseado para esta proteína a estas condiciones.

Lo que también se puede observar en las Figuras 12 y 13 son bandas de degradación de la proteína de fusión que posiblemente corresponden a la proteína con diferente número de módulos del DFA_{tag} dado que, como se indicó en los antecedentes, el DFA_{tag} puro, sufre auto-proteólisis. En la Figura 11 se pueden observar las proteínas que se producen a partir del DFA_{tag} (*Sánchez Cuapio, 2018, datos no publicados*).

Los resultados obtenidos no sustentan la hipótesis del trabajo, ya que se esperaba que la proteína Tc-DFA_{tag} inmovilizada fuera más estable que la proteína en disolución (libre), especialmente por el efecto de protección que se había observado en los ensayos realizados con fluido gástrico e intestinal simulados (*Moreno-Mendieta, 2014; Guillén, 2015*).

En estos estudios se observó que las proteínas de fusión TcDFA_{tag}, y CRDFA_{tag} eran degradadas en periodos de segundos a minutos en fluido gástrico simulado (3.2 mg/mL (m/v) pepsina, 30 mM NaCl y 86 mM HCl, pH 1.2) o intestinal simulado (10 mg/mL (m/v) pancreatina (amilasa, tripsina, lipasa, ribonucleasa, quimiotripsina y tripsina en 0.05 M KH₂PO₄ and 0.2 N NaOH, pH 7.5); sin embargo, cuando las proteínas estaban inmovilizadas en almidón mantenían mucho mayor tiempo su integridad. En consecuencia, se pensó que bajo condiciones más neutras de pH y sin la presencia de proteasa, las proteínas fueran estables al menos inmovilizadas. No obstante, la proteína en disolución resultó más estable.

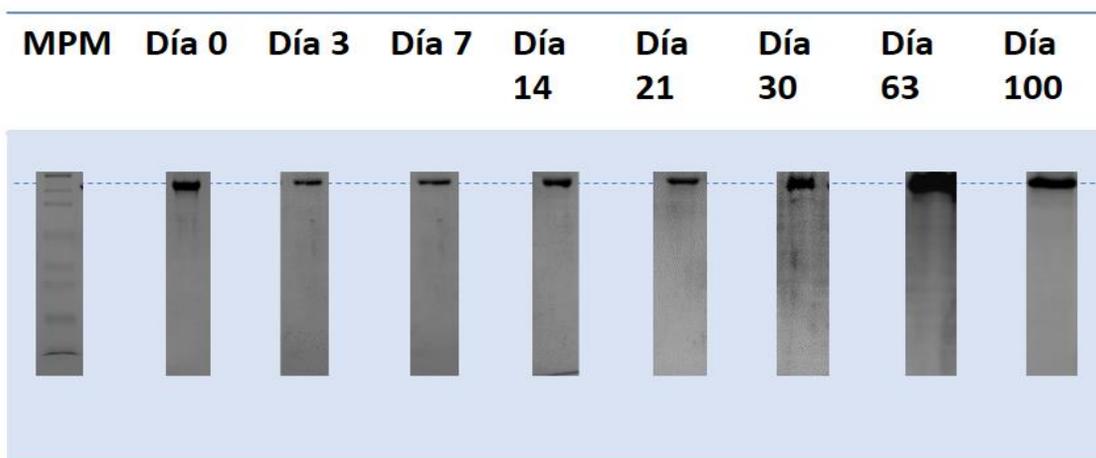
En ese momento se decidió probar una nueva estrategia de conservación secando la muestra. Esto, además permitiría lidiar con otros problemas que se podrían enfrentar en el camino y que han sido ampliamente reportados en la literatura como la contaminación microbiana que es más frecuente en muestras en disolución (*Voet, et al., 2009; Krishna, 2001*). Además, el sistema seco es más simple de conservar y transportar, el hecho de no manejar cadenas de frío trae consigo también

disminución de costos (*Sameer et al., 2017*). Se ha visto en otros casos que para conservar proteína a temperatura ambiente utilizan la liofilización, un método de deshidratación que consiste en sublimar las moléculas del agua de una muestra congelada por medio de un sistema a vacío (*patente No. WO 2009034204 A1, 2009; Sameer et al., 2017*) pero de igual manera llevar a cabo este proceso resulta caro. El método de secado que se realizó en esta prueba de estabilidad utiliza en parte este concepto; el agua libre presente en la muestra que contiene a la proteína de fusión unida al DFA_{tag} se elimina deshidratando con etanol, disolvente miscible en agua que es posteriormente eliminado por evaporación.

Por otro lado, tenemos el fenómeno de autoproteólisis que sufre el DFA_{tag}, en donde el agua puede ser un factor determinante puesto que se ha observado en otras proteínas autoproteolíticas que la molécula de agua puede actuar como nucleófilo facilitando la hidrólisis (*Sánchez Cuapio et. al, 2018, datos no publicados*). Así, se inició un nuevo monitoreo a largo plazo (100 días) pero con la proteína de fusión Tc-DFA_{tag}, secada inmediatamente después de la inmovilización (adsorción al almidón). De acuerdo con los resultados obtenidos, la proteína se purificó y dializó a pH 7.

En la Figura 15, se puede observar que la proteína inmovilizada y seca permanece intacta hasta el final del monitoreo (día 100), con la ventaja adicional de que la conservación se realizó a temperatura ambiente, lo cual evita el uso de cadenas de frío que frecuentemente se rompen, activando procesos de proteólisis y por supuesto también disminuye los costos de almacenamiento de las proteínas recombinantes.

Tc-DFA_{tag} inmovilizada en seco



Tc-DFA_{tag} libre

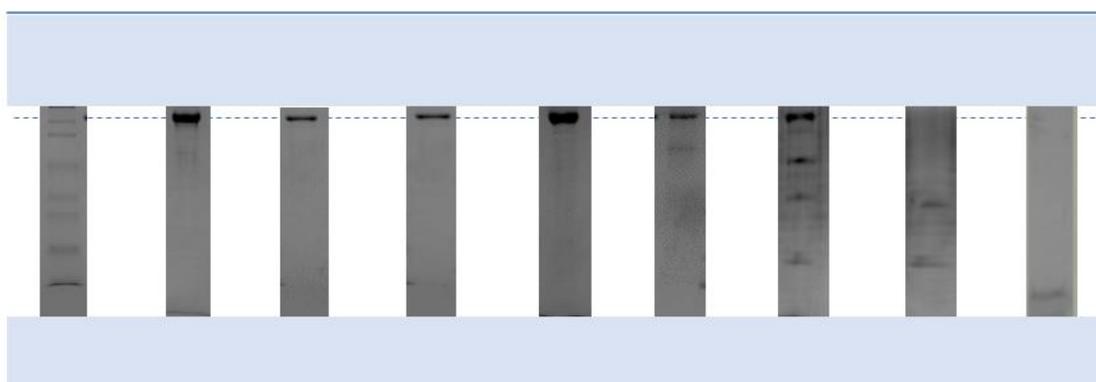


Figura 15. Tc-DFA_{tag} a pH 7, temperatura ambiente, inmovilizada en seco, día cero y día 100 (libre e inmovilizada).

En el Laboratorio Europeo de Biología Molecular (EMBL) en la Protein Expression and Purification Core Facility – sugieren 4 °C para el almacenamiento de proteínas de 1 a 7 días, pero siempre con agentes bacteriostáticos y bajar más la temperatura para almacenamientos de semanas a meses; -20 °C y congelación rápida usando nitrógeno líquido o una mezcla de hielo seco / etanol para evitar la desnaturalización, además de la adición de agentes estabilizadores (glicerol, albumina, agentes reductores o ligandos específicos) (https://www.embl.de/pepcore/pepcore_services/protein_purification/storage_purifi

ed_proteins/). En todos los casos es claro que se requiere mayor infraestructura de almacenamiento que la que se encontró.

En este punto, se obtuvo un método para el almacenamiento de proteínas fusionadas con el DFA_{tag}, pero se debía demostrar que estas condiciones funcionaban para otras proteínas de fusión. Se seleccionaron dos proteínas:

1) Una proteína de fusión, Dominio catalítico de la α -amilasa de *L. amylovorus* fusionado con tres CBM-26 (**DC3M**) una proteína con menor número de módulos del DFA_{tag}, es decir, que se une con menor afinidad al almidón, pero suficiente para ser purificada directamente sobre almidón a partir de una mezcla compleja (lisado celular), esta proteína también permitiría seguir una actividad enzimática.

2) La siguiente proteína de fusión está formada por un tándem de 5 repeticiones de los residuos 11-25 del péptido β -amiloide unido con tres CBM-26 del DFA_{tag} (**5xA β 25-3M**), péptido que es altamente hidrofóbico y forma agregados, por lo cual estabilizarla podría tener ventajas como el trabajo invitro.

10.2 DC3M

La proteína se purificó y se dializó a pH 5 (pH ideal para su purificación) y pH 7 (pH para comparar resultados con Tc-DFA_{tag}). Se observó que, en ambos pH, la proteína se purificó satisfactoriamente (Figura 16.I), sin embargo, se observa degradación de la proteína de fusión desde la primera elución, lo cual puede observarse en las bandas por debajo de la proteína mayoritaria (en el gel poco arriba del marcador de 124 KDa).

Después de dializar a ambos pH, la proteína a pH 5 se precipitó, mientras que la proteína a pH 7 se obtuvo sin problema, en la Figura 16.II se observa que efectivamente casi no hay proteína presente a pH 5 pero sí a pH 7, en el zimograma (método en Apéndice IV) se observa que la actividad amilolítica se mantiene después de la diálisis (Figura 16.II). La tabla 3 corrobora que se recupera casi seis veces más proteína a pH 7 que a pH 5 confirmando lo observado en los geles.

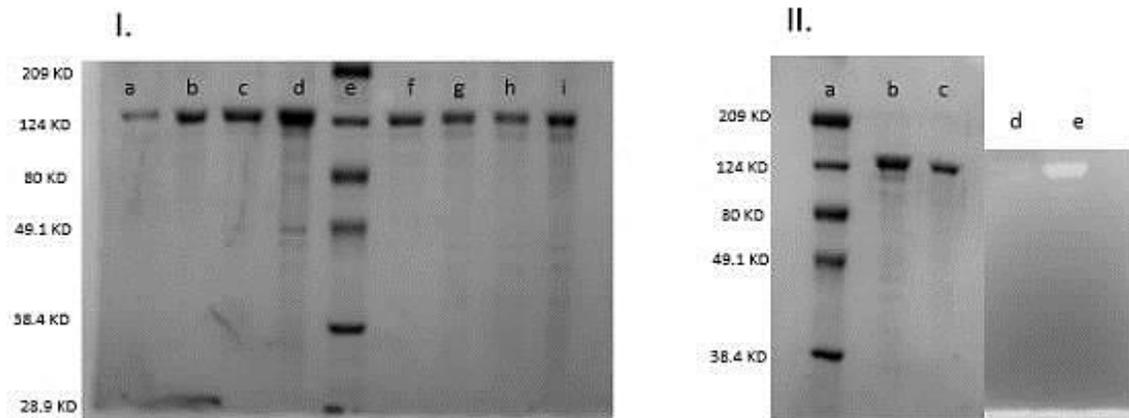


Figura 16. **I.** Gel SDS-PAGE, que muestra las eluciones de a DC3M después de la purificación a diferentes pH eluida con maltosa 100mM. **a.** elución 4 pH 5, **b.** elución 3 pH 5, **c.** elución 2 pH 5, **d.** elución 1 pH 5, **e.** Marcador de masa molar (Broad-Range Bio-Rad) **f.** elución 1 pH 7, **g.** elución 2 pH 7, **h.** elución 3 pH 7, **i.** elución 4 pH 7. **II.** Gel SDS-PAGE que muestra la proteína dializada a pH 5 Y 7. **a.** Marcador de masa molar (Broad-Range Bio-Rad) **b.** dializado a pH 7, **c.** dializado a pH 5, **d.** zimograma de DC3M después de la diálisis a pH 5, **e.** zimograma de DC3M después de la diálisis a pH 7.

Tabla 3. Cuantificación de DC3M después de la diálisis de DC3M, a pH 5 y 7

pH del buffer	5	7
Absorbancia	0.140	0.804
Concentración DC3M ($\mu\text{g} / \mu\text{L}$)	0.075	0.434

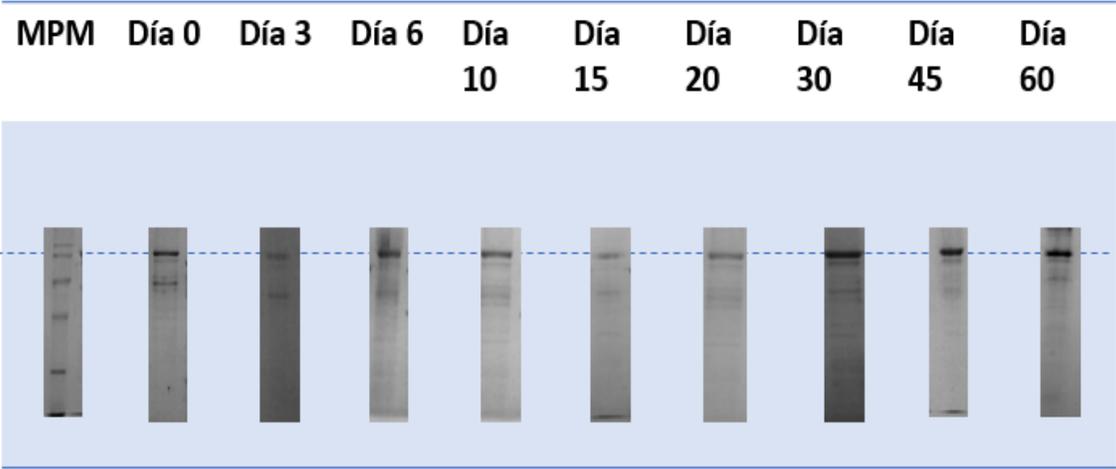
De igual forma antes realizar la inmovilización se hicieron ensayos de adsorción cualitativa de almidón insoluble (Apéndice III) mostrando que a una proporción de 1:100 proteína: almidón, se adsorbe la mayoría de la proteína de fusión al almidón. Por lo que la inmovilización se llevó a cabo bajo esta relación incluyendo el nuevo método de secado de la proteína, la proteína se almacenó a temperatura ambiente y se monitoreó en los días, 1, 3, 6, 10, 15, 20, 30, 45 y 60; por duplicado y solo a pH 7.

Después de llevarse a cabo el monitoreo (Figura 17), se puede observar que la proteína de fusión DC3M inmovilizada se estabiliza, se observan bandas de degradación, pero permanecen constantes como si el dominio catalítico estuviera presente con tres, dos y un CBM26 y esto permitiera que esas proteínas permanecieran unidas al almidón. En los zimogramas se puede observar que la actividad de la proteína de fusión está presente desde el principio de la inmovilización y hasta el final del seguimiento, pero en este gel es más evidente la autoproteólisis de la proteína al ser más sensible el método. Sorprendentemente a partir del día 15 solo se observa una banda de actividad que, aunque más tenue, permanece ya sin cambios.

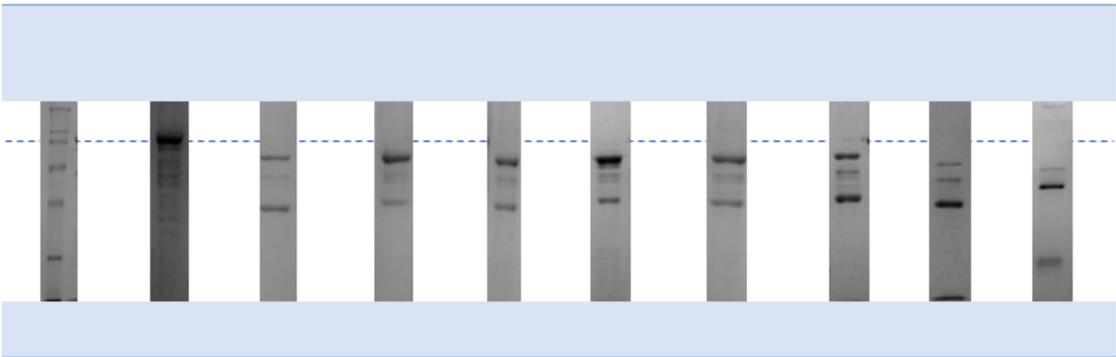
Mientras tanto la proteína que se encuentra en disolución y que también permaneció a temperatura ambiente, comienza a degradarse desde el día tres evidenciando nuevamente la proteólisis del DFA_{tag} que está unido a esta proteína de fusión (*Sánchez Cuapio, 2018, datos no publicados*) la degradación sucede más rápidamente, pero se encontró actividad catalítica sobre almidón soluble hasta el último día del monitoreo, lo cual nos indica estabilidad del dominio catalítico.

I

DC3M inmovilizada en seco

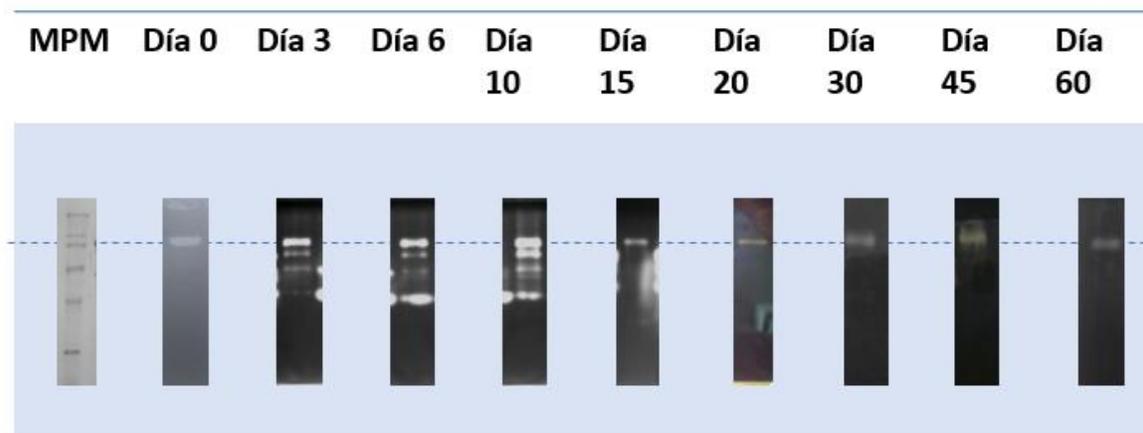


DC3M libre



II

DC3M inmovilizada en seco



DC3M libre

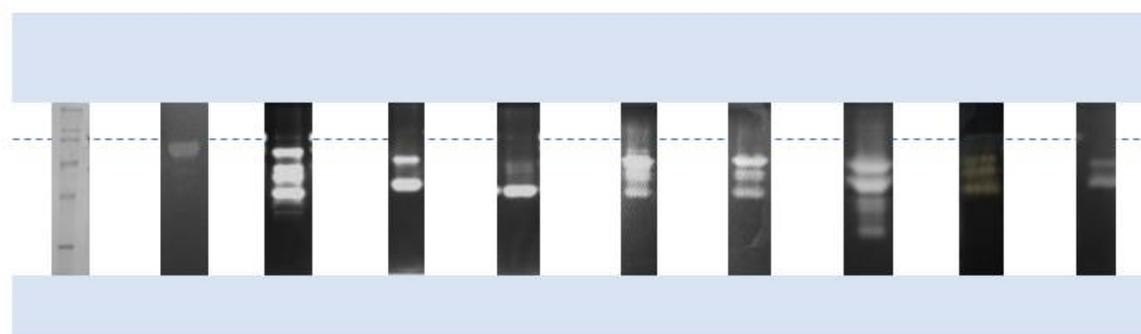


Figura 17. I.DC3M a pH 7 temperatura ambiente, inmovilizado y libre; II. Zimograma de DC3M a pH 7 temperatura ambiente, inmovilizado y libre.

Dado los resultados que se presentan para la proteína de fusión DC3M, se observó que las condiciones que se utilizaron para conservar a Tc-DFA_{tag} también aplican para el almacenamiento de proteínas fusionadas a tres CBM-26. Ya que al utilizar el sistema DFA_{tag} y llevar a cabo el método de secado permite la conservación de la proteína de fusión DC3M por más tiempo.

10.3 5xAb β 25-3M

La proteína se purificó de acuerdo con el protocolo que ya había sido desarrollado por Vasquez Martínez en el 2017 ya que la purificación de esta proteína de fusión presenta muchas dificultades. Esta se realiza a pH 6.5 (pH ideal para su purificación), pero también se probó pH 7 para comparar con Tc-DFA_{tag} y DC3M. En

ambos pH se logró purificar la proteína de manera satisfactoria, mostrando la banda característica de 5x $A\beta$ 25-3M alrededor de los 49 kDa (Figura 18). Como ya lo había reportado Vázquez Martínez en el 2017, la proteína precipita durante la diálisis y en nuestra observación más a pH 6.5 que a pH 7, en la Figura 18 se puede observar que la proteína más limpia o con menos bandas por debajo de 49 KD se obtiene después de la diálisis a pH 7. Se observan bandas que no solo muestran degradación sino también la formación de agregados. Cuando se cuantifico la proteína de ambos pH, se observa que la concentración de la proteína a pH 6.5 es menor en comparación del pH 7 (Tabla 4).

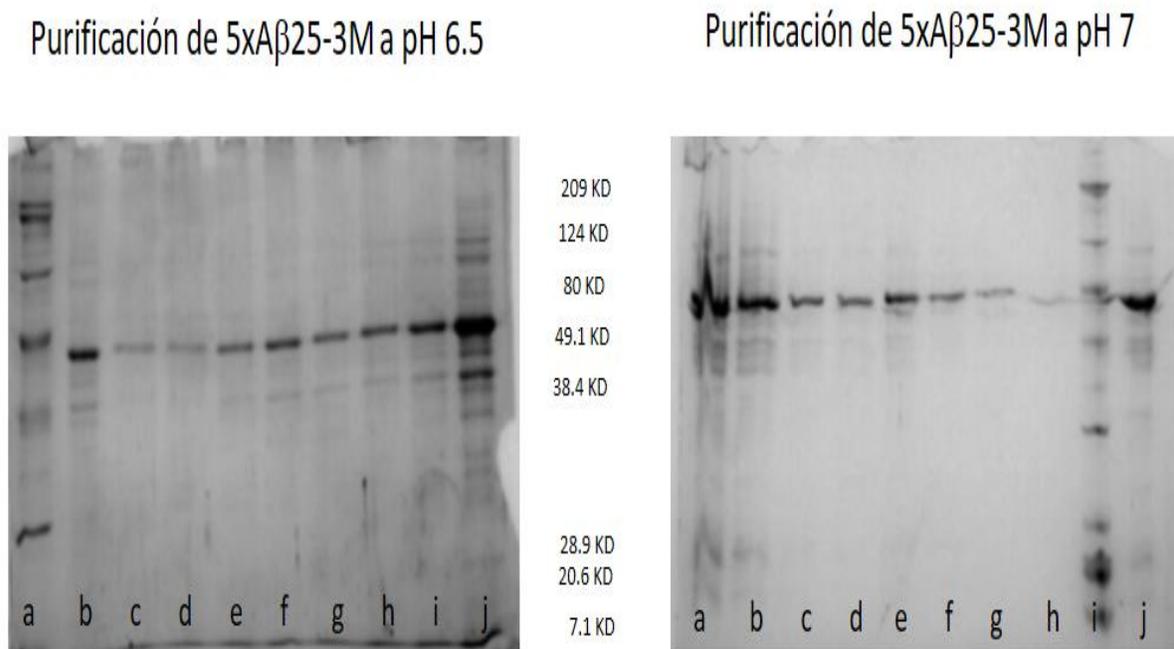


Figura 18. Geles SDS-PAGE, que muestra las eluciones de 5x $A\beta$ 25-3M después de la purificación eluida con β -ciclodextrina 8mM. **Purificación de 5x $A\beta$ 25-3M a pH 6.5.** a. Marcador masa molar (Broad-Range Bio-Rad) b. elución 1, c. elución 2, d. elución 3, e. elución 4, f. elución 5, g. elución 6, h. elución 7, i. elución 8. j. dializado. **Purificación de 5x $A\beta$ 25-3M a pH 7.** a. elución 1, b. elución 2, c. elución 3, d. elución 4, e. elución 5, f. elución 6, g. elución 7, h. elución 8, i. Marcador masa molar (Broad-Range Bio-Rad, j. dializado.

Tabla 4. Cuantificación de 5xAb β 25-3M después de la diálisis de 5xAb β 25-3M a pH 6.5 y 7

pH del buffer	6.5	7
Absorbancia	0.300	0.860
Concentración 5xAb β 25-3M (μ g / μ L)	0.225	0.647

Para aumentar la cantidad de proteína pura se repitió el experimento anterior a pH 7. En la Figura 19 se puede observar las eluciones de la purificación y la diálisis exhaustiva de este segundo experimento. Claramente se observa que la proteína recuperada sufre agregación y degradación, que se elimina parcialmente en la diálisis (Figura 19, carril g). Por la naturaleza del péptido β -amiloide utilizado en esta construcción, se consideró que esta sería la mayor pureza que se podría obtener, así que la inmovilización se realizó bajo las mismas condiciones, en una relación 1:100 proteína: almidón y la proteína inmovilizada o en disolución se almacenó a temperatura ambiente y por último se monitoreó en los días, 1, 3, 6, 10, 15, 20, 30, 45 y 60; por duplicado.

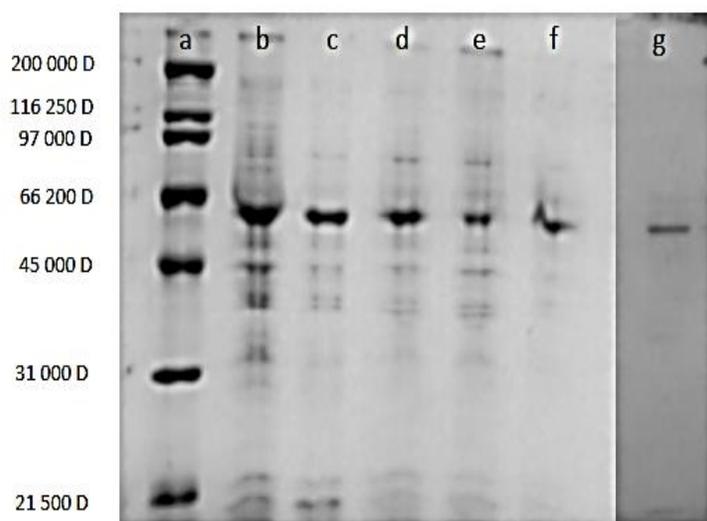


Figura 19. Gel SDS-PAGE, que muestra las eluciones de 5xAb β 25-3M a pH 7 después de la nueva purificación eluida con β -ciclodextrina 8mM. **a.** Marcador de masa molar (Broad-Range Bio-Rad) **b.** elución 1, **c.** elución 2, **d.** elución 3, **e.** elución 4, **f.** elución 5, **g.** dializado.

Una vez llevado a cabo el monitoreo de esta proteína de fusión se pudo observar (Figura 20) que para la proteína que se encuentra inmovilizada y con el método de secado es más estable en comparación con la libre, ya que conforme transcurre el tiempo del monitoreo la proteína inmovilizada presenta una banda con mayor intensidad alrededor de los 66 kDa hasta el final del experimento. Lo que también se observó en la proteína inmovilizada es que, por arriba de la banda principal, a partir del día 3 se ve la formación de otras bandas con menor intensidad, pero que se ven presentes a lo largo del monitoreo, estas bandas también se observan en las eluciones, pero que al dializar la proteína de fusión desaparecen.

Se sabe que el péptido solo, forma agregados amiloides ($A\beta$) importantes en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer (*Snyder et al., 1994 y Finder et al., 2010*), la tendencia a formar estos agregados in vitro en disolución se da en función del pH y de los residuos hidrofóbicos que contenga el $A\beta$ (*Vásquez Martínez, 2017*). En este trabajo, el fragmento que se está utilizando contiene los residuos del 11 al 25, los cuales están directamente involucrados en la polimerización de $A\beta$ (*Tjernberg et al., 1999*). En consecuencia, es probable que las bandas que se observan por arriba de la banda característica de $5x A\beta_{25-3M}$ se deban a la formación de agregados del $A\beta$ que tal vez se desprenden de la misma proteína de fusión.

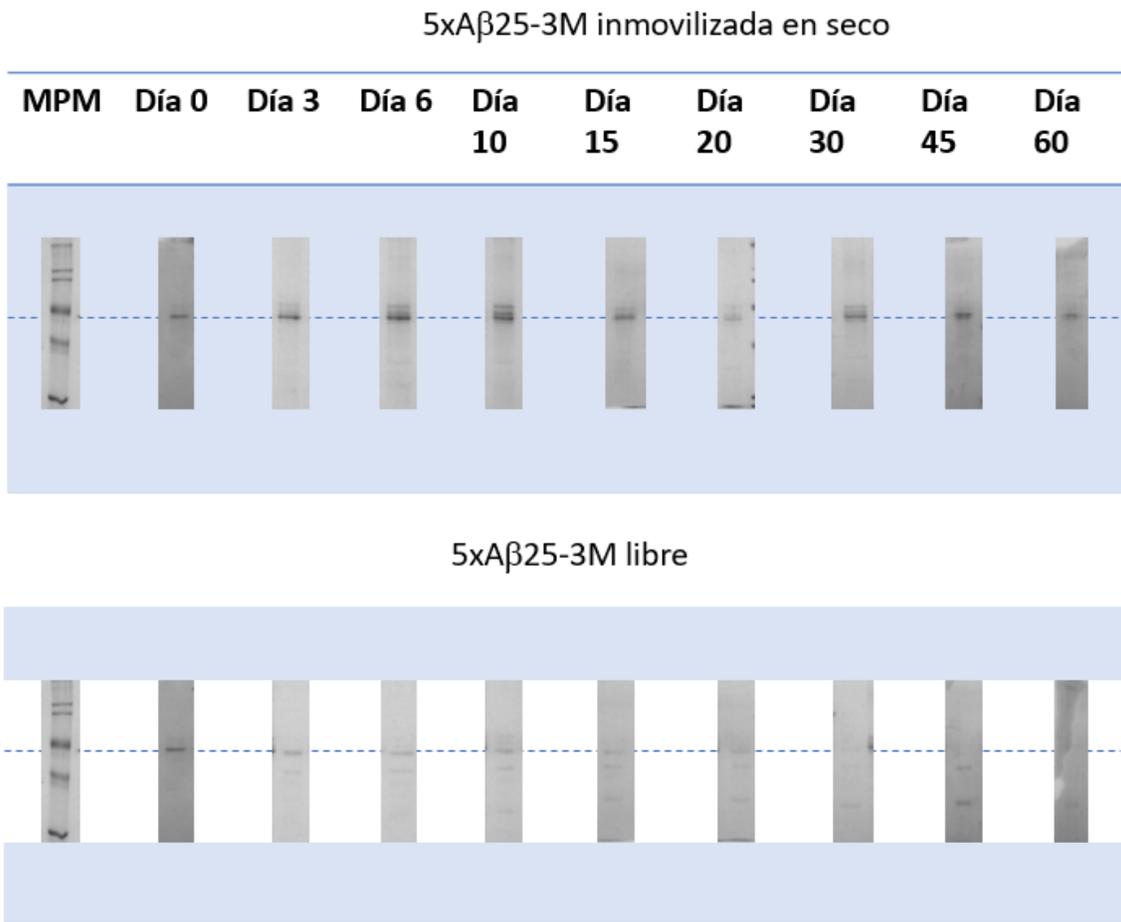


Figura 20. 5xA β 25-3M a pH 7, temperatura ambiente, inmovilizada en seco (superior) y libre (inferior).

Como se observa, el sistema “inmovilización y secado” utilizado para la conservación de proteínas de fusión (Tc-DFA_{tag} y DC3M) también parece aplicar para el fragmento 11 al 25 del péptido β -amiloide fusionado al DFA_{tag} (5xA β 25-3M), ya que la proteína 5xA β 25-3M permanece más tiempo estable que la proteína que se encuentra en solución, aunque quedaría pendiente realizar un western-blot con anticuerpo contra el fragmento para observar si las bandas presentes por encima de la banda característica son realmente agregados de la proteína que se formaron en el almacenamiento.

10.4 Discusión general

La estabilización de proteínas puras es un tema importante tanto para la industria como para la investigación. Las proteínas puras son usualmente inestables y pueden sufrir cambios que las inactiven durante el almacenamiento. Las principales modificaciones son desnaturalización, agregación, degradación y proteólisis entre otros (*Deller et al., 2016*); si estos factores se pausaran por un determinado tiempo, las proteínas podrían permanecer estables hasta su uso, extendiendo su aplicabilidad en la industria química, farmacéutica y de alimentos.

Las proteínas puras son inmovilizadas sobre los gránulos de almidón, vía el DFA_{tag}. En términos generales todos los dominios proteínicos que unen carbohidratos lo hacen a través de interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno. Los estudios realizados en los dominios de unión al almidón de la familia CBM26 (Carbohydrate-binding module, por sus siglas en inglés), familia a la que por su secuencia primaria pertenece este DFA, se ilustra en la Figura 8. Puede observarse que el un triptófano y una tirosina se apilan con los anillos piranosa de la maltosa mientras que otra tirosina, un ácido glutámico, una glicina y una asparagina forman puentes de hidrógeno. Todas estas interacciones débiles permiten en su conjunto formar una unión estable.

El análisis cualitativo de la estabilidad en disolución del Tc-DFA_{tag}, mostró en términos generales que la proteína que se encontraba libre (no inmovilizada) permanecía más estable que cuando estaba inmovilizada al almidón insoluble. Este resultado, contrario a lo esperado, nos llevó a probar la eliminación del agua libre del sistema, pensando en el fenómeno autoproteolítico que se había observado sucedía espontáneamente en el DFA_{tag} y que muy probablemente pasa por el reordenamiento de un enlace peptídico para la formación de un acilo (*Sánchez-Cuapio, 2018*). El mecanismo implica un ataque nucleofílico intramolecular por un grupo -XH de Ser, Thr o Cys en el carbono carbonílico del aminoácido adyacente para generar un intermediario hidroxioxazolidina o un anión hidroxitiazolidina. El intermediario cíclico recién formado puede ser N -protonado, dando como resultado un éster. Entonces, el enlace éster es atacado por un segundo nucleófilo -XH, dando

como resultado la escisión de la proteína. En la autoproteólisis estándar, la escisión se realiza por hidrólisis, con una molécula de agua que actúa como el segundo nucleófilo (Guan, 1998) (Figura 21).

La proteína fue secada después de inmovilizarla y se observó que la proteína fue estable al menos hasta por 100 días que se realizó el seguimiento. El descubrimiento de este nuevo método de conservación de proteínas muestra ventajas como la simplicidad del sistema, la proteína es almacenada a temperatura ambiente, no utilizan cadenas de frío para su conservación, lo que redundaría en disminución de costos (Sameer et al., 2017), además de que el sustrato al que se inmoviliza se puede encontrar en abundancia en la naturaleza (Guillen et al., 2013).

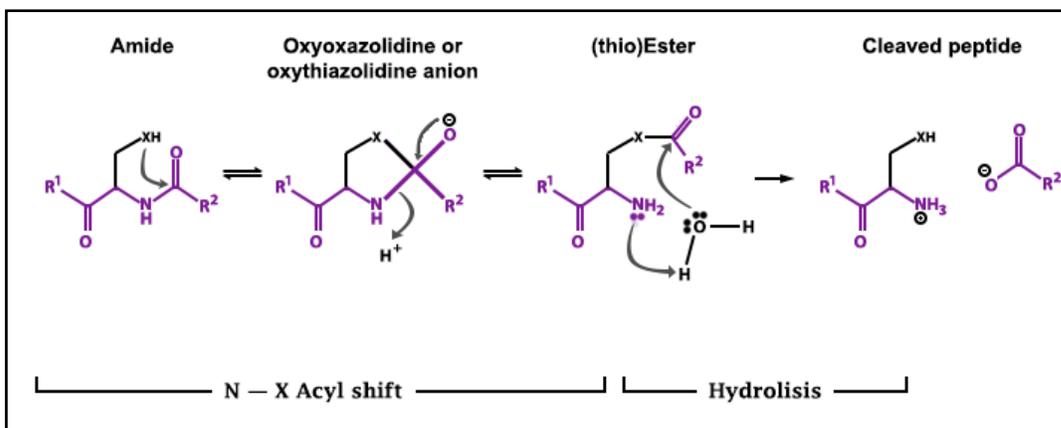


Figura 21. Mecanismo estándar de hidrólisis del enlace peptídico iniciado por un desplazamiento de acilo N-X (X = O, S).

Para tener la certeza de que el método es viable, se probaron otras proteínas con algunas variantes, la primera que tuviera solo tres CBM-26 en lugar de cinco, lo cual ya de inicio desestabiliza las proteínas; la segunda utilizar una proteína que nos permitiera medir una actividad biológica, por lo que utilizamos el dominio catalítico de la alfa-amilasa de *L. amylovorus* y la tercera utilizar una proteína que se agrega naturalmente, el péptido beta-amiloide.

Los resultados después del análisis cualitativo para esta proteína de fusión fueron favorables, como sucedió para Tc-DFA_{tag}, la proteína inmovilizada en seco permanecía más estable que la proteína que estaba libre (no inmovilizada). Además de que DC3M tuvo actividad catalítica durante todo el monitoreo. Lo cual se comprueba una vez más que el método de “estabilidad en seco” permite mantener estables a las proteínas de fusión por más tiempo.

En el caso de la proteína de fusión propuesta del A β (5xA β 25-3M), en estudios previos se había reportado que existía la dificultad para expresar A β en *E. coli* debido a la toxicidad y pobre solubilidad que tenía este péptido, se habla también de la utilización de diferentes etiquetas de afinidad para aumentar su expresión, mostrando mejoras en la solubilidad y la prevención de toxicidad (*Hortschansky et al., 2005, Macao et al., 2008, Zhang et al., 2009, Vásquez Martínez, 2017*). El uso del sistema DFA_{tag} como etiqueta de afinidad (*Guillen et al., 2013*) para la inmovilización de este péptido permitió la obtención de la proteína en forma soluble por una vía económica y, como sucedió con las otras dos proteínas de fusión (Tc-DFA_{tag} y DC3M), la inmovilización y posterior secado estabilizó por más tiempo a la proteína de fusión, aunque se observó que aún inmovilizada la proteína formó agregados.

11. Conclusiones

Se logró establecer un método general de almacenamiento de proteínas el cual consiste básicamente en la fusión de las proteínas con el DFA_{tag}, su inmovilización sobre almidón y su posterior secado. El método desarrollado ayuda a limitar la autoproteólisis de las proteínas, permitiendo alargar su vida útil.

Las condiciones del método general de almacenamiento de proteínas de fusión (estabilidad en seco) aplican para proteínas fusionadas al DFA_{tag} completo, como a tres CBM-26 del DFA_{tag}, demostradas con DC3M y 5xAβ25-3M.

Se encontró que las mejores condiciones para mantener estables a las tres proteínas de fusión probadas fueron temperatura ambiente y pH 7. Condiciones suaves y en las que no se requiere el uso de cadenas de frío, lo cual resulta muy interesante por los costos que implica mantener bajas temperaturas. Con este método las proteínas permanecieron estables al menos dos meses a temperatura ambiente, lo cual evidentemente tendrá un impacto positivo sobre cualquiera de las aplicaciones biotecnológicas ya demostradas, pero en especial en las encaminadas al desarrollo de vacunas para las vías mucosas.

12. Bibliografía

- Aguilera Ruiz, P. (2012). **Inmovilización del fragmento C de la toxina del tétanos a gránulos de almidón.** Tesis para obtener el título de Licenciado en Química Farmacéutico Bióloga. UNAM. Facultad de Química.
- Armenta, S. (2018). **Estudio de la interacción LaCBM26-almidón.** Tesis para obtener el título de Doctor en Ciencias. Posgrado en Ciencias Bioquímicas, UNAM. En proceso de tesis de doctorado.
- Boraston A, Healey M, Klassen J, Ficko-Blean E, Van Buereb A and Law V. (2006). **Estructural and functional analysis of α -glucan recognition by family 25 and 26 carbohydrate-binding modules reveals a conserved mode of starch recognition.** Journal of biological chemistry, 281:587-598.
- Deller, M C., Kong L y Rupp B (2016). **Protein stability: a crystallographer's perspective.** Acta Crystallographica Section F is a rapid structural biology communications journal, 2016 feb 1; 72(pt 2):72-95.
- Es I, Goncalves V, JD and Correa A, A. (2015). **Principles, techiques, and applications of biocatalyst immobilization for industrial application.** Applied Microbiology and Biotechnology, (2015) 99:2065-2082.
- Farjado O R, Osuna C J A, Velázquez M C V, Escalante M P e Ibarra J V. (2011). **Inmovilización de células y enzimas.** Revista científica de la Universidad de Autónoma de Coahuila. Volumen 3, No. 6.
- Finder VH, Vodopivec I, Nitsch RM, Glockshuber R. (2010). **The recombinant amyloid-beta peptide AB-42 aggregates faster and is more neurotoxic than synthetic AB-42.** Journal of Molecular Biology, 396(1); 9-18.

- García, B, Aguilera, P, Castro H y Rodríguez, S. (2012). **Estructura y Función de los Dominios de Fijación al Almidón**. Biotecnología, Vol. 16 No. 411.
- Giraud, E. and Cuny, G. (1997). **Molecular characterization of the α -amylase genes of *Lactobacillus plantarum* A6 and *Lactobacillus amylovorus* reveals an unusual 3' end structure with direct tandem repeats and suggests a common evolutionary origin**. Gene 198:149-157.
- Guan, C. (1998). **Characterization and Functional Analysis of the Cis-autoproteolysis Active Center of Glycosylasparaginase**. Journal of Biological Chemistry, 273(16), pp.9695-9702.
- Guillen D, Santiago M, Linares L, Pérez R, Morlón J, Ruiz B, and Rodríguez Sanoja R. (2007). **Alpha-Amylase Starch Binding Domains: Cooperative Effects of Binding to Starch Granules of Multiple Tandemly Arranged Domains**. Applied and Environmental Microbiology, 73(12): 3833-3837.
- Guillén D. (2015). **Inmovilización de antígenos en almidón insoluble**. Doctorado en Ciencias Bioquímicas, UNAM.
- Guillén D., Moreno M S., Aguilera P., Sánchez S., Farres A., Rodríguez S R., (2013). **The starch-binding domain as a tool for recombinant protein purification**. Applied Microbiology and Biotechnology, (2013) 97:4141-4148.
- Guillén D, Moreno M S, Pérez R, Espitia C, Sánchez S, Rodríguez S R. (2014). **Starch granules as a vehicle for the oral administration of immobilized antigens**. Carbohydrate polymers, 112; 210-215.

- Guillen S, D. (2005). **Funcionalidad de dos y tres dominios de fijación al almidón insoluble de la [alfa]-amilasa de Lactobacillus amylovorus/** tesis para obtener el título de Químico Farmacéutico Biólogo, UNAM, Facultad de Química.
- Gutiérrez, BJ. (2000). **Ciencia Bromatologica, Principios generales de los alimentos.** Diaz de Santos, pag 268.
- Hortschansky P, Schroeckh V, Christopeit T, Zandomenighi G, and Fändri M. (2005). **The aggregation kinetics of Alzheimer´s B-amyloid peptide is controlled by stochastic nucleation.** Proteín Science, 14(7); 1753-1759.
- Horváthova V, Janecek S. and Sturdik E. (2001) **Amylolytic Enzymes: Molecular Aspects of their Properties.** General Physiology and Biophysics. 20:7-32.
- Krishna PN. (2001). **Enzyme technology: pacemaker of biotechnology.** PHI learning Pvt Ltd. pag. 264.
- Macao b, Hoyer W, Sandberg A, Brorsson AC, Dobson CM, and Härd T. (2008). **Recombinat amyloid beta-peptide production by coexpression with an affibody ligand.** BMC Biotechnology, 8:82 10.1186/1472-6750-8-82.
- MacGregor E, Janecek S and Svensson B. (2001). **Relationship of sequence and structure to specificity in the α -amylase family of enzymes.** Biochimica et Biophysica Acta 1546 82001) 1-20.

- Manterola M, AM. (2015). **Estudio funcional de tres modulos de unión del SBD de la α -amilasa de *Lactobacillus amylovorus***/ tesis de maestro en ciencias, UNAM, Ciudad de México.
- Moreno-Mendieta S. A. (2014). **Micropartículas de almidón como vehículo para la administración de antígenos vía mucosa**. Doctorado en Ciencias Biomédicas, UNAM.
- Oliveira C, Carvalho V, Domingues L, Gama FM. (2015). **Recombinant CBM-fusion technology – applications overview**. *Biotechnology Advances* 33 (2015) 358-369.
- Raimond and Charles. (2002). **Introducción a la química de los polímeros**. Editorial revert, S.A. Barcelona. Bogota. Buenos Aires, Caracas, México, 1995, 2a reimpresión: enero de 2002, pag 191.
- Rao SV, Anderson KW, Bachas LG. (1968). **Oriented immobilization of proteins**. *Microchimica Acta*, September 1968, Volume 128, issue 3, pp 127-143.
- Rodriguez S, Oviedo N, Escalante L, Ruiz B and Sánchez S. (2009). **A single residue mutation abolishes attachment of the CBM26 starch-binding domain from *Lactobacillus amylovorus* α -amylase**. *Microbial Biotechnology* (2009) 36:341-346.
- Rodriguez Sanoja R, Morlon Guyot J, Jore J, Pintado J, Juge N and Guyot JP (2000). **Comparative characterization of complete and truncated forms of *Lactobacillus amylovorus* α -amylase and role of the C-terminal direct repeats in raw-starch binding**. *Applied and Environmental Microbiology*. 66:3350–3356.

- Sammer P, N. Jagdish K, Z, Rajendra N, S. Sambhaji S, P. Ravi M. Subhas G, B. Sunil G. Rajeev M, D. (2017). **Stability of heat Stable, live attenuated Rotavirus vaccine (ROTASSIL®)**. Vaccine 35(2017)2962-2969.
- Sánchez Cuapio Z. (2018). **Caracterización del fenómeno que causa la proteólisis en el Dominio de Fijación al Almidón (DFA) de la alfa-amilasa de Lactobacillus Amylovorus**. Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Investigaciones Biomédicas. En proceso de tesis de doctorado.
- Santiago, M; Linares, L; Sanchez, S. and Rodriguez Sanoja, R. (2005). **Functional characteristics of the Lactobacillus amylovorus α -amylase starch binding domain**. Biologia Bratislava.
- Snyder S, Lador US, Wade WS, Wang GT, Barrett LW, Matayoshi ED and Holzman TF. (1994). **Amyloid-beta aggregation: selective inhibition of aggregation in mixtures of amyloid with different chain lengths**. Biophysical Journal, 67(3);1216-1228.
- Tester R, Karkalas J & Qi X (2004). **Starch composition, fine structure and architecture**. Journal of Cereal Science. 39:151-165.
- Tjernberg LO, Callaway DJ, Tjernberg A, Hanhe S, Lilliehöök C, Terenius L, Nordstedt C. (1999). **A molecular model of Alzheimer amyloid beta-peptide fibril formation**. The journal of Biological Chemistry, 274(18); 12619-12625.
- Van der Maarel M, van der Veen B, Uitdehaag J, Leemhuis H and Dijkhuizen. (2002). **Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family**. Journal of Biotechnology. 94:137-155.

- Vasquez M, N. (2017). **Potencial adyuvante del sistema DFA- Almidón para inducir respuesta inmune al péptido β -amiloide**. Tesis de maestro en ciencias UNAM, Ciudad de México.
- Voet Donald, Voet Judith G y Pratt Charlotte. (2009). **Fundamentos de bioquímica: la vida a nivel molecular**. Segunda edición, Buenos Aires; Médica Panamericana, 2009. 1264 pags.
- Wang s, Cui GZ, Song XF, Feng Y, Cui Q. (2012). **Efficiency and stability enhancement of cis-epoxysuccinic acid hydrolase by fusión with carbohydrate binding module and immobilization onto cellulose**. Applied Biochemistry and Biotechnology 2012; 168:708-17.
- Zhang L, Yu H, Song C, Lin X, Chen B, Tan C and Wang Z. (2009). **Expression, purification, and characterization of recombinant human beta-amyloid 42 peptide in Escherichia coli**. Protein Expression and Purification, 64(1); 55-62.
- <http://www.google.com/patents/WO2009034204A1?cl=es>. Método de conservación de péptidos o proteínas, WO 2009034204 A1. Ultima visita 18 junio 2017 2:35 am.
- https://www.embl.de/pepcore/pepcore_services/protein_purification/storage_purified_proteins/. Ultima visita 7 de noviembre 2017 1:28 pm.
- <http://www.cazy.org/> Ultima visita 11 de noviembre de 2017 8:24 pm.
- <http://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionario/def/proteina-de-fusion>. Ultima visita 6 de abril de 2018 3:30 pm.

13. Apéndice

I. Medio de cultivo Luria Bertani (BL)

Compuesto	Cantidad (g/L)
Triptona	10
Extracto de levadura	5
NaCl	10

II. Protocolo para realizar geles SDS-PAGE

Técnica utilizada para separar mezclas complicadas de proteínas, de acuerdo con su movilidad electroforética, el cual nos ayuda a identificar subunidades de las proteínas y comprobar la homogeneidad de las muestras. Lo que determina la migración de los geles de poliacrilamida son cuatro factores principales como son el tamaño del poro del gel, la carga de la proteína, el tamaño de la proteína y por último la forma de la proteína. Sistema aniónico cargado negativamente. Ya que las proteínas están cargadas negativamente ubicándose en la superficie del gel y deben migrar al polo positivo, que es la parte de abajo del sistema.

- *Preparación del gel*

1. Se ensamblan las placas de vidrio para formar el gel, verificando que no haya fugas agregándole un poco de agua entre ellos.

Se prepara el gel de separación acrilamida al 10 %. Se agrega a los vidrios aproximadamente 5 cm de altura.

♣ Preparación para un gel SDS-PAGE

Reactivo	Gel separador
Agua	1.6 mL
Tris HCL 0.5 M pH 6.8	
Tris HCL 1.5 M pH 8.8	1 mL
Acrilamida 30%	1.33 mL
SDS 10%	40 μ L
Persulfato de amonio 10%	28 μ L
TEMED	6.5 μ L

2. Se le agrega agua destilada hasta el tope de los vidrios para que sea uniforme la superficie.
3. Después de que polimerizó el gel separador se remueve el agua destilada y se colocan suavemente los peines para poder agregar el gel concentrador.
4. Se prepara el gel concentrador 4%.

♣ Preparación para un gel SDS-PAGE

Reactivo	Gel concentrador
Agua	0.968 mL
Tris HCL 0.5 M pH 6.8	0.4 mL
Tris HCL 1.5 M pH 8.8	
Acrilamida 30%	213 μ L
SDS 10%	16 μ L
Persulfato de amonio 10%	12 μ L
TEMED	2.7 μ L

5. Se agrega poco a poco el gel concentrador hasta el tope de los vidrios evitando la formación de burbujas.
6. Polimerizado el gel, se pre-corre 20 min a 20 mA.

- *Preparación de las muestras*

- 1) Se colocan las muestras en tubos eppendorf, se le agrega buffer de carga al 6X.

- ♣ Preparación de buffer de carga 6X

Reactivo	cantidad
Agua	1.15 mL
Tris HCL 0.5 M pH 6.8	1.25 mL
Glicerol	1 mL
SDS 10%	2 mL
2-β-mercaptano	0.50 mL
Azul de bromo fenol	0.25 mL

- 2) Enseguida se hierven 5 min a 95 °C. Después se colocan en hielo hasta ser cargadas en el gel.

- *Condiciones de migración*

- 1) Por cada gel que se corra es a 20 mA durante aproximadamente 1 h, hasta donde se desee el frente, en una cámara de electroforesis para proteínas (Bio-Rad) con buffer de migración 10X.

- ♣ Preparación de buffer de migración 10X. (1L)

Reactivo	cantidad
Tris base 30 g	30 g
Glicina 144 g	144 g
SDS	10 g

- *Revelado del gel*

- 1) Una vez terminada la migración se separa el gel de los vidrios y se pone a teñir con azul de comasie aproximadamente 30 min.

♣ Preparación de azul de comasie

Reactivo	cantidad
Stok 1.	0.2 % de azul de comasie 90 % de etanol
Stok 2.	20 % de ácido acético.

2) Se destiñe el gel con una solución de destinción y se observa visualmente.

♣ Preparación de solución de destinción

Reactivo	cantidad
Etanol	20 %
Ácido acético glacial	10 %
Agua destilada	70 %

III. Ensayos de adsorción al almidón

Después de haber obtenido la concentración de cada una de las proteínas de fusión. Se realizaron pruebas de adsorción al almidón, para ver en que radio de almidón la proteína se adsorbía totalmente con 4 μg de proteína. Para eso se preparó almidón de arroz a una concentración de 200 $\mu\text{g} / \mu\text{L}$.

- Cuantificación de Tc-DFA_{tag}

pH del buffer	7
Absorbancia	1.02
Concentración Tc-DFA_{tag} ($\mu\text{g} / \mu\text{L}$)	0.57

Ejemplo de los cálculos:

$$\frac{4 \mu\text{g} (1 \mu\text{L})}{0.57 \mu\text{g}} = 7.01 \mu\text{l de proteína}$$

$$\frac{100\mu\text{g} (1 \mu\text{L})}{200 \mu\text{g}} = 0.5 \mu\text{L dealmidón}$$

Proteína (μL)		Almidón (μL)
7.01	1:25	0.5
7.01	1:50	1
7.01	1:75	1.5
7.01	1:100	2

1. Con los cálculos obtenidos, en tubos eppendorf se pone a incubar por 2 ha la proteína con su respectivo almidón.
2. Después de transcurrido el tiempo, los tubos se centrifugan 1 min a 13 000 rpm, para posteriormente separar el sobrenadante del almidón.
3. A las muestras se les agrega 5 μL de buffer de carga 6X, y se hierven 5 min a 95 °C los sobrenadantes y 1 min el pellet de almidón con la proteína.
4. Se cargan las muestras en un gel SDS-PAGE para visualizar en que radio se adsorbió completamente la proteína (Figura I).

Ensayos de adsorción de TcDFA_{tag}

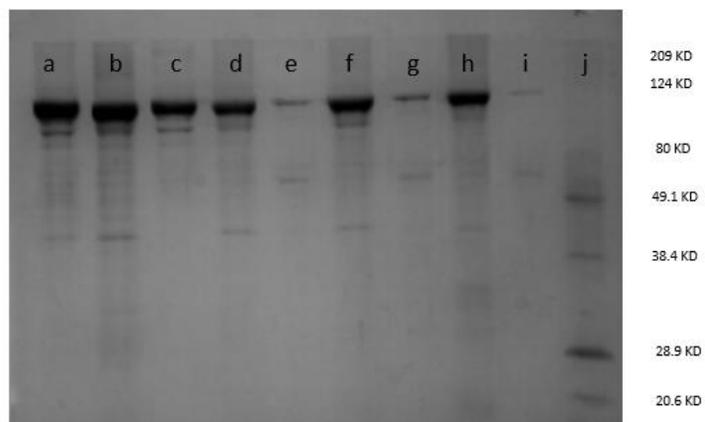


Figura I. Gel SDS- que muestra el ensayo de adsorción de la proteína Tc-DFA_{tag} en almidón. a) proteína control Tc-DFA_{tag}, b) almidón 1:25, c) sobrenadante 1:25, d) almidón 1:50, d) sobrenadante 1:50, e) almidón 1:75 f) sobrenadante 1:75, g) almidón 1:100, h) sobrenadante 1:100 y i) Marcador de masa molar (Broad-Range Bio-Rad).

Los mismos pasos se realizan para los ensayos de adsorción de las siguientes proteínas, solo que con 5 µl de proteína.

o Cuantificación de DC3M

pH del buffer	7
Absorbancia	0.804
Concentración DC3M (µg /µL)	0.434

Proteína (µL)		Almidón (µL)
11.52	1:25	0.625
11.52	1:50	1.25
11.52	1:100	2.5

- Después de seguir los pasos 1, 2 y 3. Se cargan las muestras en un gel SDS-PAGE para visualizar en que radio se adsorbió completamente la proteína (Figura II).

Ensayos de adsorción de DC3M

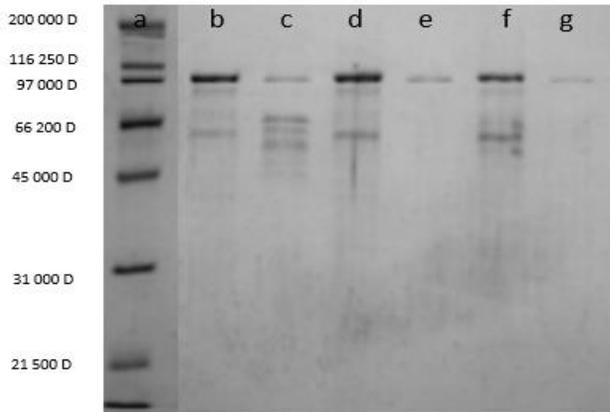


Figura II. Gel SDS- que muestra el ensayo de adsorción de la proteína DC3M en almidón. a) Marcador de masa molar (Broad-Range Bio-Rad). b) almidón 1:25, c) sobrenadante 1:25, d) almidón 1:50, e) sobrenadante 1:50, f) almidón 1:100, g) sobrenadante 1:100.

- Cuantificación de 5x $A\beta$ 25-3M

pH del buffer	7
Absorbancia	0.860
Concentración 5x$A\beta$25-3M ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	0.647

Proteína (μL)		Almidón (μL)
7.72	1:10	0.250
7.72	1:25	0.625
7.72	1:50	1.25
7.72	1:100	2.5

1. Después de seguir los pasos 1, 2 y 3. Se cargan las muestras en un gel SDS-PAGE para visualizar en que radio se adsorbió completamente la proteína (Figura III).

Ensayos de adsorción de 5x $A\beta$ 25-3M

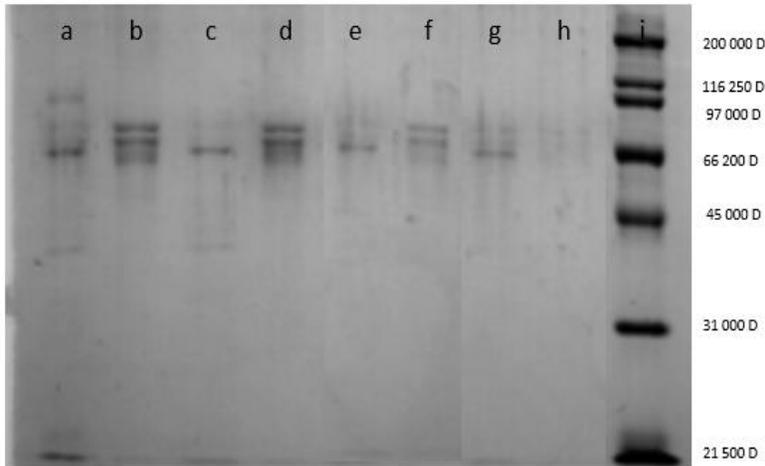


Figura III. Gel SDS- que muestra el ensayo de adsorción de la proteína 5x $A\beta$ 25-3M en almidón. a) almidón 1:10, b) sobrenadante 1:10, c) almidón 1:25 d) sobrenadante 1:25 e) almidón 1:50, f) sobrenadante 1:50, g) almidón 1:100, h) sobrenadante 1:100 y i) Marcador de masa molar (Broad-Range Bio-Rad).

IV. Técnica para realizar zimograma

Técnica que electroforética que permite observar la actividad de enzimas. Es realizado en gel de poliacrilamida utilizando condiciones suaves por lo que no contiene agentes reductores lo cual nos ayuda a que no se pierda la actividad de las enzimas de estudio.

El zimograma que se utilizó en este trabajo, es hecho a partir de geles SDS-PAGE. Nos ayuda a visualizar la actividad de la α -amilasa por la aparición de bandas claras en un fondo oscuro al adicionar una solución de yodo-yoduro. El modo de acción del yodo es introduciéndose en el interior de amilosa; cuando la α -amilasa degrada al almidón esta hélice se rompe por lo que el yodo ya no puede alojarse en el interior.

- *Modo de preparación*

1. El gel se realiza como un SDA-PAGE normal.
2. Las muestras que son utilizadas para el zimograma primero se eluyen con β -ciclodextrina 8 mM, durante 10 min. A la elución se le agrega 5 μ L de buffer de carga 6x, y se hierven por 5 minutos a 95 °C, inmediatamente se ponen en hielo para después ser cargadas en el gel.
3. Las muestras se cargan en el gel después de haber precorrido el gel de poliacrilamida.
4. Después de corrido el gel, se saca de los vidrios para después ser lavado tres veces con buffer citrato fosfato 10 mM a pH 5. La duración de cada lavado es de 15 min con agitación para ayudar a eliminar el SDS del gel.
5. Después de los lavados se deja en el mismo buffer toda la noche a 4 °C.
6. El gel se encuba durante 2 h con buffer citrato fosfato a pH 5 que tiene adicionado almidón al 1 %.
7. Finalmente se elimina el buffer citrato fosfato que contiene almidón y se tiñe con solución de yodo-yoduro 3mL por cada 25 mL de buffer.
8. Los resultados se observan por la aparición de bandas claras en un fondo oscuro.