



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO**



**Facultad de Estudios Superiores Zaragoza**

**Producción, caracterización y replegamiento de una  
 $\alpha$ -glucosidasa quimérica de *Saccharomyces cerevisiae*  
expresada en *Escherichia coli*.**

***TESIS***

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
***QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO***

Presenta:

**IRIS ASHANTY SOTO VALERIO**

Director: Dr. Ismael Bustos Jaimes

CIUDAD DE MÉXICO

AÑO: 2017



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE: DRA. RAQUEL RETANA UGALDE**

**VOCAL: DR. ISMAEL BUSTOS JAIMES**

**SECRETARIO: DR. JOSÉ IGNACIO REGLA CONTRERAS**

**PRIMER SUPLENTE: DRA. MA. ISABEL SOTO CRUZ**

**SEGUNDO SUPLENTE: M. en C. TAIDE LAURITA ARISTA UGALDE**

**LABORATORIO DE FISICOQUÍMICA E INGENIERÍA DE PROTEÍNAS, TORRE DE INVESTIGACIÓN DE LA FACULTAD DE MEDICINA. CIUDAD UNIVERSITARIA.**

**DIRECTOR DEL TEMA:**

**DR. ISMAEL BUSTOS JAIMES**

**SUSTENTANTE:**

**IRIS ASHANTY SOTO VALERIO**

**2017**

**Este trabajo contó con recursos del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT, Proyecto IN200316).**

## **Agradecimientos:**

**Agradezco inmensamente al Dr. Ismael Bustos Jaimes por otorgarme la oportunidad de ser parte de su equipo de trabajo, por la paciencia, tiempo y conocimientos transmitidos. Así como por su apoyo en la revisión de este trabajo.**

**A todos los miembros del jurado por los comentarios y apoyo en la corrección de este escrito.**

**A la M. en C. Patricia Demare y al Dr. Ignacio Regla por todos los conocimientos transmitidos, por dejarme ser parte de su equipo de trabajo y por que gracias a ustedes llegue al LFQIP donde se realizó este trabajo.**

**Gracias infinitas a la Universidad Nacional Autónoma de México por todas las oportunidades brindadas, las instalaciones, los excelentes profesores y todas las experiencias vívidas.**

**Por mi raza hablará el espíritu**

**UNAM, 2017**

## **DEDICADO A:**

A mis padres por el apoyo brindado a lo largo de mi trayectoria académica, por todos los sacrificios que se hicieron para que pudiera concluir mis estudios y mi tesis. Por la paciencia y cariño que siempre me han tenido. Los amo.

A mis hermanos por la motivación y compañía en las noches de insomnio, especialmente a Karen por ser un pilar para todos.

A mi mami Rito por la comprensión, apoyo, viajes, comida y todas las experiencias otorgadas. Por presionar día con día para la culminación de este trabajo.

A Hugo Santillán, Jorge Marcos y Menandro Camarillo por todos los conocimientos, consejos pero sobre todo por su infinita paciencia para poder llevar a cabo este trabajo. Así como por su grandiosa amistad.

A mis hermanos de laboratorio Manu, Richi, Ivan, Arturo, Maat, Adrian, Gabriel, Erick y Sebas, por dejarme ser parte de un gran equipo de trabajo pero mas allá de lo académico por todas las experiencias compartidas, los conocimientos, las comidas y largas pláticas. Por todo mil gracias.

A todo el equipo del LFQIP por la experiencia, especialmente a Andrea, Aarón, Karla, Haven, Julio, Brayán y Fabián por los consejos, apoyo y por hacer mucho mas amena la estancia. Gracias por su valiosa amistad.

A Blanca, Adrián, Yaice, Eduardo y Víctor mis queridos compañeros de batalla, gracias por su inmensa amistad, por todos los trabajos realizados, las desveladas, la paciencia, los consejos, pláticas y viajes. Por las risas, corajes y lágrimas compartidas.

A todas las personas hermosas que conocí a lo largo de esta trayectoria, especialmente a Nadia y Nelly por ser mis ángeles. Gracias por todo amigas.

A mis amigos pedagogos, principalmente a Jesús Vega, por expandir mi mente a otras áreas del conocimiento e impulsarme a ser una mejor persona a cada momento. Por todas las experiencias que aunque pocas dejaron una gran huella en mi ser.

**A todos, gracias por el maravilloso viaje. Nos vemos en el camino.**

---

---

**Abreviaturas utilizadas**

---

---

<b><math>\alpha</math>-GI-L6H</b>	Quimera de la isomaltasa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ( $\alpha$ -1,6-glucosidasa-GGSGGSGGSG-HHHHHH)
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>LSDs</b>	Enfermedades lisosomales de almacenamiento
<b>VLPs</b>	Partículas tipo virus
<b>E.C</b>	Comisión de enzimas
<b>pH</b>	Potencial de hidrogeno
<b>GH</b>	Glucosil-hidrolasas
<b><math>\alpha</math>-MG</b>	metil- $\alpha$ -D-glucopiranosido
<b>Ima1p</b>	$\alpha$ -1,6-glucosidasa de <i>S. cerevisiae</i>
<b>pNPG</b>	4-nitrofenil- $\alpha$ -glucopiranosido
<b>ERT</b>	Terapia por re-emplazamiento enzimático
<b>ENCs</b>	Nanoacarreadores enzimáticos
<b>B19V</b>	Eritroparvovirus 1 de primate
<b>ADN</b>	Acido desoxirribonucleico
<b>PDB</b>	Banco de datos de proteínas
<b>LCMV</b>	Virus de Cariomeningitis linfocítica
<b>IgA</b>	Inmunoglobulina tipo A
<b>IgG</b>	Inmunoglobulina tipo G
<b>VP1 y VP2</b>	Proteína de cápside viral
<b>EGFP</b>	Enzima verde fluorescente mejorada
<b>DLS</b>	Dispersión dinámica de luz
<b>GndHCl</b>	Cloruro de guanidinio
<b>BpIA</b>	Lipasas de <i>Bacillus pumillus</i>
<b>RSV</b>	Virus sincisial respiratorio humano
<b>GSP II</b>	Enfermedad de almacenamiento de glucógeno tipo II
<b>GAA</b>	$\alpha$ -glucosidasa ácida
<b>EKG</b>	Electrocardiograma
<b>CK</b>	Creatinin fosofocinasa
<b>AST</b>	Aspartato aminotransferasa
<b>ALT</b>	Alanina aminotransferasa
<b>LDH</b>	Lactato deshidrogenasa
<b>DBS</b>	Manchas de sangre seca
<b>MGA</b>	Maltasa-glucoamilasa
<b>GSD III</b>	Enfermedad de almacenamiento de glucógeno tipo III
<b>LB</b>	Luria-Bertani
<b>Tris</b>	Tris(hidroximetil) aminometano

---

---

<b>EDTA</b>	Ácido etilendiamintetracético
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato sódico
<b>IPTG</b>	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido
<b>BCA</b>	Ácido bicinconínico
<b>BSA</b>	Albúmina sérica bovina
<b>HPLC</b>	Cromatografía líquida de alta resolución
<b>RNApol</b>	RNApolimerasa
<b>LB+ amp</b>	Agar Luria-Bertani con ampicilina
<b>kpb</b>	Kilo pares de bases nitrogenadas
<b>SCM</b>	Centro de Masa Espectral
<b>V<sub>0</sub></b>	Velocidad inicial
<b>Abs</b>	Absorbancia
<b>V<sub>max</sub></b>	Velocidad máxima
<b>K<sub>m</sub></b>	Constante de Michaelis-Menten
<b>K<sub>i</sub></b>	Constante de inhibición por sustrato
<b>k<sub>cat</sub></b>	Constante catalítica
<b>Act<sub>0</sub></b>	Actividad catalítica al tiempo cero
<b>Act<sub>t</sub></b>	Actividad catalítica en tiempo diferente al inicial
<b>k<sub>i</sub></b>	Constante de inactivación

---

**TABLA DE CONTENIDOS.**

<b><u>1. OTROS ÍNDICES</u></b> .....	<b>11</b>
<b>1.1 ÍNDICE DE CUADROS</b> .....	<b>11</b>
<b>1.2 ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>12</b>
<b><u>2. RESUMEN</u></b> .....	<b>14</b>
<b><u>3. INTRODUCCIÓN</u></b> .....	<b>15</b>
<b><u>4. MARCO TEÓRICO</u></b> .....	<b>17</b>
<b>4.1 ENZIMAS.</b> .....	<b>17</b>
4.1.1 GLUCOSIDASAS. ....	<b>20</b>
<b>4.2 <math>\alpha</math>-GLUCOSIDASAS DE <i>S. cerevisiae</i> (OLIGO-1,6-GLUCOSIDASA)</b> .....	<b>22</b>
4.2.1 ESTRUCTURA DE LA $\alpha$ -1,6-GLUCOSIDASA DE <i>S. cerevisiae</i> . ....	<b>24</b>
4.2.2 TOPOLOGÍAS DEL SITIO ACTIVO DE LAS GLUCOSIL HIDROLASAS. ....	<b>26</b>
4.2.3 MECANISMO DE HIDRÓLISIS. ....	<b>28</b>
<b>4.3 IMPORTANCIA INDUSTRIAL Y FARMACEÚTICA DE LAS GLUCOSIL HIDROLASAS.</b> .....	<b>32</b>
<b>4.4 NANOACARREADORES.</b> .....	<b>33</b>
4.4.1 VLPs. ....	<b>34</b>
4.4.2 VLPs DEL ERITROPARVOVIRUS 1 DE PRIMATE (PARVOVIRUS B19). ....	<b>35</b>
<b>4.5 ENFERMEDADES LISOSOMALES DE ALMACENAMIENTO (LSDs)</b> .....	<b>38</b>
4.5.1 FUNCIÓN ENDOSOMA-AUTOFAGO-LISOSOMA Y SU DISFUNCIÓN EN LSDs.....	<b>40</b>
4.5.2 ENFERMEDAD DE ACUMULACIÓN DE GLUCÓGENO TIPO II/ENFERMEDAD DE POMPE. ....	<b>42</b>
4.5.2.1 Fenotipos de la enfermedad de Pompe. ....	<b>42</b>
4.5.2.2 Diagnóstico diferencial. ....	<b>44</b>

4.5.3 ENFERMEDAD DE ACUMULACIÓN DE GLUCÓGENO TIPO III/ENFERMEDAD DE CORI FORBES. ....	<b><u>50</u></b>
4.5.3.1 Fenotipos de la enfermedad de Cori-Forbes. ....	<b><u>50</u></b>
4.5.3.2 Confirmación diagnóstica. ....	<b><u>51</u></b>
<b><u>5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.</u></b> .....	<b><u>54</u></b>
<b><u>6. HIPÓTESIS.</u></b> .....	<b><u>55</u></b>
<b><u>7. OBJETIVOS.</u></b> .....	<b><u>55</u></b>
7.1 GENERAL. ....	<b><u>55</u></b>
7.2 PARTICULARES. ....	<b><u>55</u></b>
<b><u>8. MATERIAL Y MÉTODO.</u></b> .....	<b><u>56</u></b>
8.1 MATERIAL BIOLÓGICO. ....	<b><u>56</u></b>
8.2 MEDIOS DE CULTIVO. ....	<b><u>56</u></b>
8.3 AMORTIGUADORES. ....	<b><u>56</u></b>
8.4 REACTIVOS QUÍMICOS. ....	<b><u>57</u></b>
8.5 EQUIPOS. ....	<b><u>58</u></b>
8.6 INSTRUMENTOS. ....	<b><u>58</u></b>
8.7 MATERIAL. ....	<b><u>59</u></b>
8.8 ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO. ....	<b><u>59</u></b>
8.8.1 TRANSFORMACIÓN DE <i>E. coli</i> CEPA BL21(DE3). ....	<b><u>60</u></b>
8.8.2 PURIFICACIÓN DEL PLÁSMIDO. ....	<b><u>62</u></b>
8.8.3 DIGESTIÓN DEL PLÁSMIDO PURIFICADO. ....	<b><u>63</u></b>
8.8.4 EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE ( $\alpha$ -GI-L6H). ....	<b><u>64</u></b>
8.8.5 PURIFICACIÓN DE $\alpha$ -GI-L6H. ....	<b><u>65</u></b>
8.8.6 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN PROTEÍCA DE $\alpha$ -GI-L6H. ....	<b><u>66</u></b>
8.8.7 DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE $\alpha$ -GI-L6H.....	<b><u>68</u></b>

8.8.8 PRUEBAS DE DESNATURALIZACIÓN ENZIMÁTICA/ RE-PLEGAMIENTO ENZIMÁTICO. ....	<b><u>69</u></b>
8.8.9 DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS CINÉTICOS DE $\alpha$ -GI-L6H A PARTIR DE LAS VELOCIDADES INICIALES (V0) DE REACCIÓN PARA LA HIDRÓLISIS DEL 4-NITROFENIL- $\alpha$ -GLUCOPIRANOSIDO (pNPG). ....	<b><u>73</u></b>
8.8.10 ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN CONDICIONES EX-VIVO (25°C, pH 7) Y CONDICIONES LISOSOMALES (37°C, pH 5). ....	<b><u>74</u></b>
<b><u>9. RESULTADOS Y ANÁLISIS.</u></b> .....	<b><u>77</u></b>
<b>9.1 TRANSFORMACIÓN <i>E. coli</i> CEPA BL21(DE3).</b> .....	<b><u>77</u></b>
<b>9.2 PURIFICACIÓN DEL PLÁSMIDO.</b> .....	<b><u>77</u></b>
<b>9.3 EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE <math>\alpha</math>-GI-L6H.</b> .....	<b><u>78</u></b>
<b>9.4 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN PROTEÍCA (MÉTODO BCA).</b> .....	<b><u>82</u></b>
<b>9.5 DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA <math>\alpha</math>-GI-L6H.</b> .....	<b><u>83</u></b>
<b>9.6 PRUEBAS DE RE-PLEGAMIENTO ENZIMÁTICO.</b> .....	<b><u>85</u></b>
9.6.1 RE-PLEGAMIENTO ENZIMÁTICO SEGUIDO POR TLC. ....	<b><u>85</u></b>
9.6.2 RE-PLEGAMIENTO ENZIMÁTICO SEGUIDO POR HPLC. ....	<b><u>87</u></b>
9.6.3 RE-PLEGAMIENTO ENZIMÁTICO SEGUIDO POR FLUORESCENCIA. ....	<b><u>89</u></b>
9.6.4 RE-PLEGAMIENTO ASISTIDO POR ALMIDÓN Y GLUCÓGENO. ....	<b><u>92</u></b>
<b>9.7 DETERMINACIÓN DE LOS VALORES CINÉTICOS DE <math>\alpha</math>-GI-L6H.</b> .....	<b><u>95</u></b>
<b>7.8 INACTIVACIÓN DE <math>\alpha</math>-GI-L6H EN CONDICIONES EX-VIVO Y LISOSOMALES.</b> .....	<b>99</b>
<b><u>10.0 CONCLUSIONES.</u></b> .....	<b><u>104</u></b>
<b>10.1 PERSPECTIVAS.</b> .....	<b>105</b>
<b><u>11.0 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.</u></b> .....	<b><u>107</u></b>

## 1. OTROS ÍNDICES

### 1.1 ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 4.1 Actividades enzimáticas específicas. Tomado de Deng et al, 2014. .....	(pp. 23)
Cuadro 4.2 Diagnósticos diferenciales similares a la enfermedad de Pompe en su forma infantil. Tomado de Kishnani et al, 2006.....	(pp. 44)
Cuadro 4.3 Diagnósticos diferenciales similares a la enfermedad de Pompe en su forma tardía. Tomado de Kishnani et al, 2006.....	(pp. 45)
Cuadro 4.4 Niveles en orina del Glc <sub>4</sub> en pacientes con LSD. Tomado de An. Y et al, 2000.....	(pp. 47)
Cuadro 4.5 Niveles en suero de Glc <sub>4</sub> en pacientes con LSD. Tomado de An. Y et al, 2000.....	(pp. 48)
Cuadro 4.6 Actividades de la GAA en manchas de sangre seca. Tomado de Umaphysivam. K et al, 2001.....	(pp. 49)
Cuadro 4.7 Diagnóstico diferencial para la enfermedad de Cori-Forbes. Tomado de Kishnani et al, 2010.....	(pp. 52)
Cuadro 8.1 Mezcla para la digestión del plásmido purificado.....	(pp. 63)
Cuadro 8.2 Diseño experimental para la determinación de la concentración proteica por método de BCA.....	(pp. 67)
Cuadro 8.3 Diseño experimental para la determinación de $V_0$ de la $\alpha$ -GI-L6H usando pNPG.....	(pp. 74)
Cuadro 8.4 Diseño experimental para los análisis de estabilidad en condiciones ex-vivo y lisosomales.....	(pp. 76)
Cuadro 9.1 Comparación de valores teóricos y experimentales del peso moléculas del gen IMA1p y de la $\alpha$ -GI-L6H.....	(pp. 79)
Cuadro 9.2 Propiedades fisicoquímicas para la $\alpha$ -GI-L6H mediante PROTPARAM.....	(pp. 81)
Cuadro 9.3 Determinación de la concentración para la $\alpha$ -GI-L6H.....	(pp. 83)
Cuadro 9.4 Comparación entre los modelos de ajuste enzimático.....	(pp. 97)

Cuadro 9.5 Constantes catalíticas de la  $\alpha$ -GI-L6H a partir del modelo de Inhibición por sustrato.....(pp. 98)

Cuadro 9.6 Comparación de constantes catalíticas de la  $\alpha$ -GI-L6H contra los reportados por Deng y colaboradores.....(pp. 99)

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 4.1 Estructura completa de la  $\alpha$ -1,6-glucosidasa de *S. cerevisiae*.....(pp. 25)

Figura 4.2 Topología de los sitios activos de las glucosil-hidrolasas.....(pp. 27)

Figura 4.3 Topologías del sitio activo de la  $\alpha$ -1,6-glucosidasa de *S. cerevisiae*.  
.....(pp. 27)

Figura 4.4 Mecanismo de acción con inversión de la configuración anomérica.....(pp. 29)

Figura 4.5 Mecanismo de acción con retención de la configuración anomérica.....(pp. 30)

Figura 4.6 Detalle de los residuos catalíticos de la  $\alpha$ -1,6-glucosidasa de *S. cerevisiae*.....(pp. 31)

Figura 4.7 Cascada hipotética de eventos de la mayoría de las enfermedades de acumulación de sustrato.....(pp. 41)

Figura 8.1 Vector de clonación pET22b(+)......(pp. 60)

Figura 8.2 Región de clonación del vector pET22b(+)......(pp. 61)

Figura 8.3 Representación del gen diseñado para los experimentos ( $\alpha$ -GI-L6H).  
..... (pp. 62)

Figura 9.1 Purificación del plásmido incorporado a *E. coli*.....(pp. 78)

Figura 9.2 SDS-PAGE de la sobre-expresión de la  $\alpha$ -GI-L6H.....(pp. 79)

Figura 9.3 SDS-PAGE de la purificación de la  $\alpha$ -GI-L6H.....(pp. 81)

Figura 9.4 Curva patrón de BSA mediante el método de BCA.....(pp. 82)

Figura 9.5 Cromatografía en capa fina para controles.....(pp. 84)

Figura 9.6 Cromatografía en capa fina para las reacciones enzimáticas con almidón y glucógeno como sustrato. Enzima nativa.....(pp. 85)

Figura 9.7 Cromatografía en capa fina para las reacciones enzimáticas con almidón y glucógeno como sustrato. Enzima re-plegada.....	(pp. 86)
Figura 9.8 Superposición de los cromatogramas obtenidos para reacciones enzimáticas con almidón como sustrato.....	(pp. 87)
Figura 9.9 Superposición de los cromatogramas para las reacciones enzimáticas con glucógeno como sustrato.....	(pp. 88)
Figura 9.10 Espectro de fluorescencia de la $\alpha$ -GI-L6H.....	(pp. 89)
Figura 9.11 Gráfico SCM vs concentración de GndHCl.....	(pp. 90)
Figura 9.12 Gráfico de las $V_0$ para enzima nativa y re-plegada.....	(pp. 91)
Figura 9.13 Reacciones enzimáticas para pNPG (5 mM) re-plegando mediante diálisis asistida.....	(pp. 92)
Figura 9.14 Cromatografía en capa fina para almidón re-plegando con diálisis asistida por almidón.....	(pp. 93)
Figura 9.15 Cromatografía en capa fina para glucógeno re-plegando con diálisis asistida por glucógeno.....	(pp. 94)
Figura 9.16 Curva patrón de 4-nitrofenol.....	(pp. 95)
Figura 9.17 Ajuste al modelo de inhibición por sustrato para la $\alpha$ -GI-L6H.....	(pp. 97)
Figura 9.18 Estabilidad enzimática a 25° C y pH 7 de la $\alpha$ -GI-L6H.....	(pp. 102)
Figura 9.19 Estabilidad enzimática a 37° C y pH 5 de la $\alpha$ -GI-L6H.....	(pp. 103)
Figura 10.1 Anclaje de antígenos a VLPs. Tomado de Brune et al, 2016....	(pp. 106)

## 2. RESUMEN

Muchas enzimas tienen potencial farmacológico, sin embargo, esta acción depende de la correcta entrega a la célula diana y de la integridad de la conformación activa de las enzimas. Teniendo esto en consideración la nanotecnología ha desarrollado diversos nano acarreadores que sirven como soporte, estabilizadores y transportadores enzimáticos. Uno de estos acarreadores son las Partículas Tipo Virus (VLPs), que son ensamblajes moleculares de los componentes estructurales de los virus sin el material genético. Nuestro grupo tiene amplia experiencia en ensamblar VLPs de parvovirus B19 (B19V). En nuestro caso, se estudió la actividad de una  $\alpha$ -glucosidasa quimérica de *Saccharomyces cerevisiae* ( $\alpha$ -GI-L6H) expresada en *Escherichia coli*, poniendo especial atención en su actividad catalítica para sustratos como almidón y glucógeno, antes y después de desnaturalizarla y re-plegarla. Es importante conocer si esta proteína es capaz de re-plegarse *in vitro*, ya que al estar fusionada con la proteína VP2, con la cual se hacen VLPs de B19V, se desea que sea capaz de recuperar su actividad catalítica en las mismas condiciones en que se pliegan y ensamblan las VLPs. Se comprobó que la  $\alpha$ -GI-L6H presenta actividad catalítica tanto contra almidón como contra glucógeno, por lo que podría utilizarse para tratar enfermedades metabólicas de la degradación del glucógeno en el humano. Sin embargo, la quimera no recuperó su actividad catalítica una vez re-plegada, lo que hace suponer que una quimera de esta enzima con VP2 no se plegaría correctamente para formar VLPs con actividad catalítica.

### 3. INTRODUCCIÓN

El adecuado funcionamiento celular se debe en gran medida a los catalizadores biológicos que aceleran las reacciones químicas a niveles que hacen posible la vida. Con excepción de los RNAs catalíticos, los catalizadores biológicos son las enzimas. Éstas son proteínas y sus propiedades funcionales, incluyendo la catálisis, dependen de la integridad de la conformación nativa de la proteína. Cuando la actividad enzimática es crítica para algún proceso celular y se presenta ausencia total o parcial de la proteína o de su actividad catalítica, resulta en alteraciones metabólicas que pueden variar en grado de mortalidad.

Un ejemplo de esto son las enfermedades lisosomales de almacenamiento (LSDs), que como su nombre lo indica, presentan acumulación de sustratos de diferente naturaleza como glucógeno, mucopolisacáridos, esfingolípidos o glicoproteínas. Estas enfermedades pueden ser tratadas por reemplazamiento de la enzima defectuosa; lo complicado del tratamiento es llevar a la enzima, íntegra y activa, al blanco celular, que en este caso es el lisosoma.

Una ruta de acceso a este sistema es obviamente el sistema de endocitosis celular que los virus usan como método para acceder al interior de la célula, haciendo gala de diversos mecanismos que les permiten escapar posteriormente del lisosoma sin ser degradados. La capacidad de los virus para reconocer receptores superficiales en las células radica en los componentes superficiales de los propios virus. Estos mismos receptores pueden conservarse en las partículas

tipo virus (VLPs), que son ensamblajes de los componentes estructurales de los virus sin contener material genético, por lo que no son infecciosas y en consecuencia son más seguras que los virus. Además, en la superficie de las VLPs se pueden colocar enzimas activas, sirviendo como nano acarreadores que proporcionan estabilidad a la enzima y como vectores que brindan especificidad por un tipo celular.

Se sabe también que las isomaltasas (EC 3.2.1.10) hidrolizan los enlaces  $\alpha$ -1,6-glucosídicos en los extremos no reductores del glucógeno o el almidón. Se puede usar una de estas enzimas como modelo para explorar si es posible plegarla *in vitro* para su posterior presentación en una VLP. En este trabajo expresamos una quimera de la  $\alpha$ -1,6-glucosidasa de *Saccharomyces cerevisiae* en *Escherichia coli*, para establecer sí en las condiciones de ensamble *in vitro* de VLPs de B19V, esta enzima recupera su actividad catalítica y así sentar las bases para una línea de investigación que pudiese en un futuro colaborar con la mejora en la calidad de vida de pacientes con LSDs.

## 4. MARCO TEÓRICO

### 4.1 ENZIMAS

La enorme variedad de reacciones bioquímicas que comprende la vida, está mediada casi en su totalidad por un conjunto de catalizadores biológicos denominados “enzimas”. Con la excepción de un pequeño grupo de RNAs catalíticos, todas las enzimas son proteínas<sup>1,2</sup>. Sus propiedades funcionales, incluyendo la actividad catalítica dependen de la integridad de la conformación proteica nativa, es decir, si una enzima es desnaturalizada o disociada en sus subunidades, la actividad catalítica usualmente se pierde. De la misma manera, si una enzima se despliega hasta su conformación lineal, la actividad catalítica siempre desaparece. Por lo tanto, las estructuras proteicas primaria, secundaria, terciaria, y cuaternaria (cuando la hay) son esenciales para su actividad catalítica. Existen muchas razones por las que una proteína podría no tener su estructura nativa. La exposición *ex vivo* de las proteínas a condiciones adversas, como pH extremo, temperaturas altas, detergentes y metales pesados, pueden alterar la estructura nativa llevándola a un estado inactivo. *In vivo*, la estructura está en un delicado balance entre las proteínas que se sintetizan y las que se degradan. En ambos casos hay mecanismos que hacen más eficiente el plegamiento, como es el caso de las chaperonas, y de la degradación las proteasas. Sin embargo, la estructura puede no estar afectada por las condiciones ambientales dentro de la célula, sino por mutaciones en los genes que codifican dichas proteínas. Estas mutaciones pueden resultar en un plegamiento anómalo de las proteínas, afectar

la interacción de la enzima con su sustrato o reducir dramáticamente su capacidad catalítica.

Las enzimas poseen propiedades importantes que no todos los catalizadores químicos cumplen<sup>2</sup>:

1. Altas velocidades de reacción: en general, las velocidades de las reacciones catalizadas por enzimas se multiplican de  $10^6$  a  $10^{12}$  con respecto a las mismas reacciones no catalizadas por ellas.
2. Condiciones moderadas de reacción: las reacciones catalizadas por enzimas tienen lugar en condiciones relativamente suaves: temperaturas inferiores a  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ , presión atmosférica normal y pH cercano a la neutralidad.
3. Mayor especificidad de reacción: las enzimas tienen un grado de especificidad enorme, es decir, que las reacciones enzimáticas rara vez tienen productos secundarios en cantidades importantes.
4. Capacidad de regulación: la actividad catalítica de muchas enzimas varía en respuesta a las concentraciones de sustancias distintas a sus sustratos y productos. Entre los mecanismos de estos procesos reguladores se incluyen el control alostérico, la modificación covalente de las enzimas y la variación de las cantidades de enzimas sintetizadas (expresión genética).

Las fuerzas no covalentes de unión entre enzimas, sustratos y otras moléculas implican interacciones de van der Waals, electrostáticas, de puente de hidrógeno e hidrófobas. En general, la especificidad catalítica de las enzimas está

determinada por su sitio activo. Este lugar generalmente se presenta como una cavidad o hendidura en la superficie de una molécula enzimática, en cierto modo esta región es complementaria al sustrato (complementariedad geométrica). Además, los residuos de aminoácidos que forman el sitio de unión se disponen para interactuar de manera específica con el sustrato por atracción (complementariedad electrónica)<sup>1,2</sup>.

Las moléculas que difieren en la forma o en la distribución del grupo funcional del sustrato no pueden unirse a la enzima en forma productiva, es decir, no pueden formar el complejo enzima-sustrato, complejo propuesto por primera vez por Charles Adolphe Wurtz en 1880, que es el punto de partida para los tratamientos matemáticos que definen el comportamiento cinético de la catálisis enzimática y las descripciones teóricas de los mecanismos enzimáticos que llevan a la formación de los productos<sup>1,2</sup>.

Existen diferentes clasificaciones para la gran variedad de enzimas que se conocen. En 1934 en respuesta a la cantidad de enzimas descritas la Comisión de Enzimas (E.C.) de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB) organizó los nombres de éstas y las clasificó en seis clases. Cada clase se subdivide a su vez en subgrupos con el propósito de especificar en forma inequívoca el tipo de reacción catalizada<sup>3</sup>.

El código numérico de las enzimas es una identificación numérica derivada de la clasificación, contiene cuatro dígitos separados por puntos: X.Y.Z.W.

- X: Denota la clase a la cual pertenece la enzima. Indica el cambio químico global que realiza la enzima sobre el sustrato.
- Y: Denota la subclase a la cual pertenece la enzima. Indica el cambio más específico en la transformación del sustrato.
- Z: Denota la sub-subclase a la cual pertenece la enzima. Indica mayor especificidad de los cambios señalados por Y, como por ejemplo, detallar sobre cuales átomos se realiza la catálisis, o cuales enlaces se forman, rompen o que átomos se desprenden, etc.
- W: Este último número corresponde a la identificación precisa de las sustancias sobre las cuales actúa la enzima y normalmente indica el orden en el que cada enzima se va agregando a la lista.

Uno de los grandes grupos de esta clasificación son las hidrolasas. Estas enzimas pertenecen a la clase 3, catalizan la ruptura de un gran número de biomoléculas usando como co-sustrato a una molécula de agua. Las hidrolasas más comunes incluyen a las lipasas, las glucosidasas, las proteinasas y las fosfatasas<sup>3</sup>.

#### 4.1.1 GLUCOSIDASAS

Las glucosidasas hidrolizan los enlaces glucosídicos de los carbohidratos, que son los compuestos biológicos de mayor abundancia en la naturaleza y tienen como representantes mayoritarios a los polisacáridos, macromoléculas constituidas por la polimerización de unidades moleculares de azúcares sencillos (monosacáridos). Estos polímeros presentan una variación estereoquímica natural y pueden ensamblarse en diversos isómeros<sup>3,4,5</sup>. El principal monosacárido es la glucosa,

cuya polimerización da lugar a dos polisacáridos de gran importancia para la vida: la celulosa y el almidón<sup>4</sup>.

Los organismos vivos adaptándose a esta gran diversidad de sustratos, utilizan desde oligosacáridos hasta polisacáridos para una gran cantidad de funciones biológicas como: la obtención de energía, la mitosis celular y como antígenos de reconocimiento de moléculas<sup>5</sup>. En consecuencia, existe una gran variedad de glucosidasas. Casi todos los organismos tienen una o más, variando la especificidad de sustrato entre especies<sup>5,6</sup>.

Dependiendo del sustrato específico toman diferentes nombres, las glucosíldhidrolasas (GH) se clasifican como: E.C. 3.2.1.W, donde los tres primeros números indican la propiedad de hidrolizar el enlace O-glucosídico y el cuarto (W) indica el tipo de sustrato<sup>4</sup>.

La clasificación de las GH generó más de 45 familias en sus primeras ediciones, y ha ido ampliándose con el transcurso de los años. En la actualidad se cuenta con 135 familias (disponibles en la base de datos: <http://www.cazy.org/Glycoside-Hydrolases.html>). Esta clasificación está basada en las similitudes de la secuencia de los aminoácidos que presenta cada enzima. Así, enzimas con diferente especificidad de sustrato se pueden encontrar en la misma familia, indicando una divergencia evolutiva. Esto se puede observar, por ejemplo, en las familias 1, 13 y 16. Las enzimas de la familia 13 están presentes en todo tipo de organismos vivos<sup>5</sup>. La familia 13 de las GH incluye a las  $\alpha$ -amilasas,  $\alpha$ -glucosidasas,

ciclodextrina-gluconotransferasas, pululanases, isoamilasas, enzimas ramificantes, y neopululanases<sup>7</sup>.

Además, las  $\alpha$ -glucosidasas pueden dividirse en tres tipos de acuerdo con sus especificidades de sustrato<sup>6</sup>:

- Tipo I: enzimas que hidrolizan sustratos heterogéneos con mayor eficiencia que la maltosa.
- Tipo II: enzimas que prefieren maltosa y malto-oligosacáridos, y tienen poca actividad hacia aril-glucósidos.
- Tipo III: Enzimas que tiene la misma especificidad que las tipo II y muestran elevados niveles de actividad hacia polisacáridos como la amilosa y el almidón soluble.

#### **4.2 $\alpha$ -GLUCOSIDASAS DE *S. cerevisiae* (OLIGO-1,6-GLUCOSIDASAS)**

*S. cerevisiae* contiene dos  $\alpha$ -glucosidasas, nombradas  $\alpha$ -1,4-glucosidasa (maltasa) y oligo-1,6-glucosidasa (isomaltasa). La maltasa preferencialmente hidroliza maltosa pero no isomaltosa ni metil- $\alpha$ -D-glucopiranosido ( $\alpha$ -MG), mientras que la isomaltasa hidroliza isomaltosa y  $\alpha$ -MG, pero no maltosa<sup>7</sup>.

Las oligo-1,6-glucosidasas (E.C. 3.2.1.10) hidrolizan los enlaces  $\alpha$ -1,6-glucosídicos en los extremos no reductores, manteniendo la configuración anomérica de isomalto-oligosacáridos y dextrinas<sup>8</sup>. Las Isomaltasas pueden ser clasificadas en la subfamilia 31 de la familia 13 de las glucósido hidrolasas (GH13-31), sin embargo, a diferencia de las  $\alpha$ -1,4-glucosidasas (E.C. 3.2.1.20) las

1,6-glucosidasas fallan hidrolizando enlaces  $\alpha$ -1,4-glucosídicos de los maltosacáridos. Estas distinciones en la especificidad de sustratos de la  $\alpha$ -glucosidasa se deben a las diferencias en la unión del sustrato y los dominios catalíticos de las enzimas<sup>7,8,9</sup>.

**Cuadro. 4.1.** Actividades enzimáticas específicas para diferentes sustratos (100 mM), excepto para pNPG (5 mM). La Ima1p representa a la  $\alpha$ -1,6-glucosidasa de *S. cerevisiae*. Tomada de Deng *et al.*, 2014.

Sustrato	Tipo de enlaces	Actividad específica ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ )		
		Ima1p	Ima2p	Ima3p
$\alpha$ -pNPG	4-Nitrofenil- $\alpha$ -D-glucopiranosido	5.8 (10)	7.7 (14)	3.9 (54)
$\beta$ -pNPG	4-Nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosido	0	0	0
$\alpha$ -MG	$\alpha$ -Metilglucopiranosido	52 (87)	55 (102)	11 (153)
<b>Disacáridos (Glu-Glu)</b>				
Trealosa	O- $\alpha$ -D-glucosil-(11)- $\alpha$ -D-glucosa	0	0	0
Kojibiosa	O- $\alpha$ -D-glucosil-(1-2)- $\alpha$ -D-glucosa	7.7 (13)	6.9 (13)	0
Nigerosa	O- $\alpha$ -D-glucosil-(1-3)- $\alpha$ -D-glucosa	6.5 (11)	6.8 (13)	2.5 (35)
Maltosa	O- $\alpha$ -D-glucosil-(1-4)- $\alpha$ -D-glucosa	0	0	0
Isomaltosa	O- $\alpha$ -D-glucosil-(1-6)- $\alpha$ -D-glucosa	60 (100)	54 (100)	7.2 (100)
<b>Disacáridos (Glu-Fru)</b>				
Sacarosa	O- $\alpha$ -D-glucosil-(1-2)- $\beta$ -D-fructosa	18.6 (31)	19.7 (36)	10.2 (142)
Turanosa	O- $\alpha$ -D-glucosil-(1-3)-D-fructosa	4.3 (7)	3.5 (6)	1.8 (25)
Maltulosa	O- $\alpha$ -D-glucosil-(1-4)-D-fructosa	0	0.53 (1)	0
Leucrosa	O- $\alpha$ -D-glucosil-(1-5)-D-fructosa	8.6 (14)	8.6 (16)	0
Palatinosa	O- $\alpha$ -D-glucosil-(1-6)-D-fructosa	52 (87)	76 (137)	5 (69)
<b>Trisacáridos</b>				
Maltotriosa	O- $\alpha$ -D-glucosil-(1-4)- $\alpha$ -D-glucosil-(1-4)-D-glucosa	3.5 (6)	3.4 (6)	0
Isomaltotriosa	O- $\alpha$ -D-glucosil-(1-6)- $\alpha$ -D-glucosil-(1-6)-D-glucosa	7.9 (13)	7.6 (14)	0
Melezitosa (Glu-Sac)	O- $\alpha$ -D-glucosil-(1-3)- $\beta$ -D-fructosil-(2-1)-D-glucosa	0	0	0
Panosa	O- $\alpha$ -D-glucosil-(1-6)- $\alpha$ -D-glucosil-(1-4)-D-glucosa	3.1 (5)	2.9 (5)	0

Deng y colaboradores reportan actividades específicas de la Isomaltasa Ima1p ( $\alpha$ -1,6-glucosidasa) para diferentes sustratos (Cuadro 4.1), encontrando que

efectivamente, para disacáridos con enlaces  $\alpha$ -1,4-glucosídicos (maltosa y maltulosa) no hay actividad catalítica. En contraste, para trisacáridos como la maltotriosa (O- $\alpha$ -D-glucosil-1,4- $\alpha$ -D-glucosil-1,4-D-glucosa) y la panosa (O- $\alpha$ -D-glucosil-1,6- $\alpha$ -D-glucosil-1,4-D-glucosa) si existe actividad catalítica significativa.

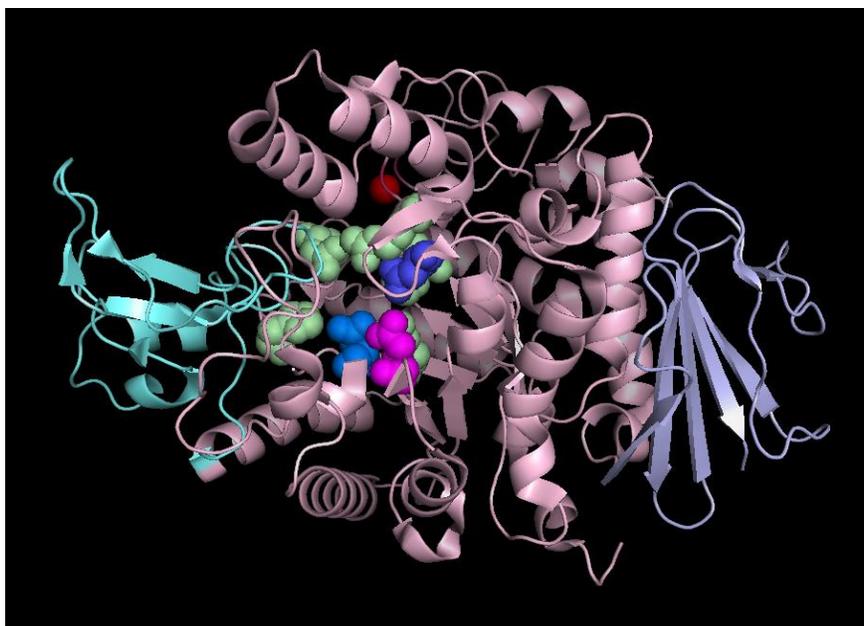
Esto podría suponer que, para polisacáridos con enlaces  $\alpha$ -1,4-glucosídicos, como el almidón o el glucógeno, la  $\alpha$ -1,6-glucosidasa de *S. cerevisiae* además de desramificar los enlaces  $\alpha$ -1,6-glucosídicos propios tendría actividad enzimática para la cadena lineal siempre y cuando contengan más de dos residuos de glucosa<sup>8</sup>.

#### 4.2.1 ESTRUCTURA DE LA $\alpha$ -1,6-GLUCOSIDASA DE *S. cerevisiae*

Todos los miembros de la familia GH13 están compuestos por tres dominios, nombrados, A, B y C. El dominio A es el dominio catalítico, compuesto de un barril ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub>; el dominio B está insertado entre la tercera hoja  $\beta$  y la hélice del barril ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> del dominio A; y el dominio C está compuesto de ocho hojas  $\beta$  en una motivo de doble llave griega<sup>7</sup>.

En el caso de la  $\alpha$ -glucosidasa de *S. cerevisiae* el dominio A está compuesto por los residuos 1-113 y 190-512, en donde se encuentran los componentes de la triada catalítica: el Asp215, que actúa como nucleófilo, el Glu277, que es el donador de protones, y el Asp352, parte importante de anclaje del sitio activo, además de tener el residuo N-terminal (Glu). El dominio B está conformado por los residuos 114-189 que forman parte del sitio catalítico en unión con el dominio A, contiene también el sitio de unión a iones calcio, ubicado debajo de la primera hélice del dominio A, con los residuos Asp30, Asn32, Asp34, Asp38, Trp36 y una

molécula de agua coordinada. El dominio C a diferencia de las glucosidasas de la familia 13, está integrado por los residuos 513-589 y consiste de 5 hebras  $\beta$  anti paralelas, de tal modo que solo 4 hebras  $\beta$  del motivo cierran el dominio A (Fig. 4.1)<sup>7</sup>.



**Fig. 4.1 Estructura completa de la  $\alpha$ -1,6-glucosidasa de *S. cerevisiae*.** Dominio A (residuos 1-113 y 190-512) mostrado en rosa, dominio B (residuos 114-189) mostrado en cian y dominio C (residuos 513-589) mostrado en lila. Sitio catalítico mostrado en esferas verdes. Residuo catalítico nucleofílico en magenta Asp215, en púrpura residuo donador de protones Glu277 y residuo catalítico de anclaje Asp352 en azul. En rojo el sitio de unión a iones calcio. (PDB 3AJ7).

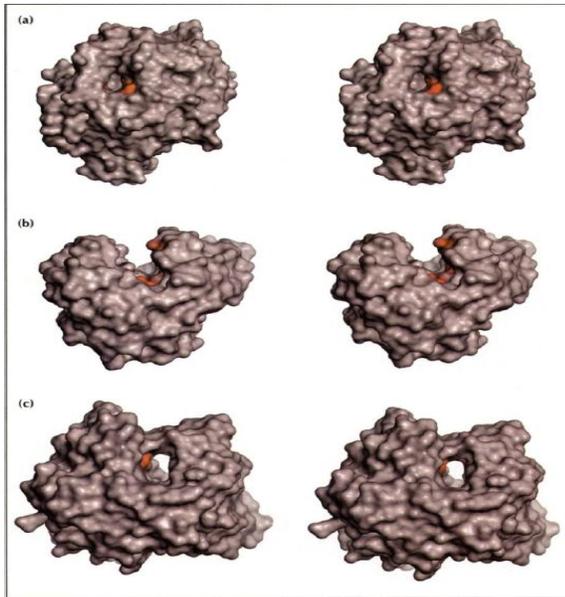
A pesar de que muchas  $\alpha$ -glucosidasas de mamíferos, plantas y microorganismos, con diversas especificidades de sustrato han sido purificadas y clonadas, aún no se ha podido aclarar qué residuos de aminoácidos de las  $\alpha$ -glucosidasas reconocen la diferencia entre enlaces  $\alpha$ -1,4 y  $\alpha$ -1,6 glucosídicos contenidos en los

polisacáridos. Yamamoto y colaboradores sugieren que la Val216 es un residuo importante para la discriminación entre estos enlaces<sup>9</sup>.

#### 4.2.2 TOPOLOGÍAS DEL SITIO ACTIVO DE LAS GLUCOSIL HIDROLASAS

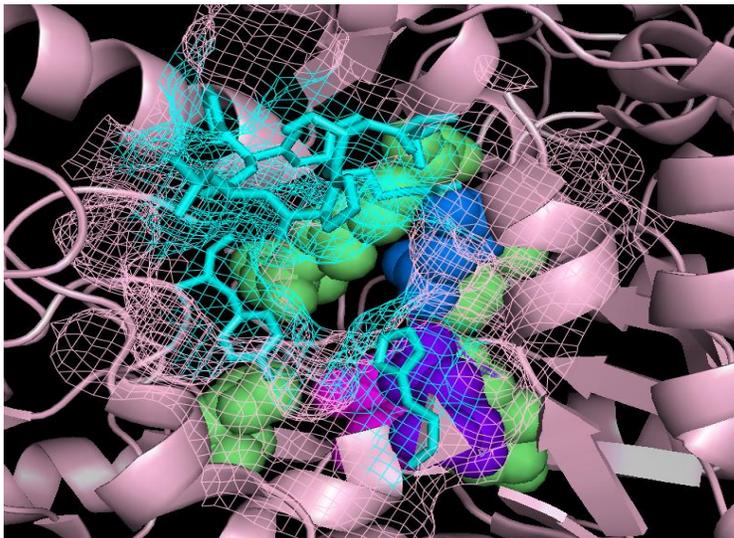
Aunque los plegamientos enzimáticos pueden clasificarse en 22 familias según su estructura tridimensional, la topología completa de los sitios activos convergen únicamente en 3 clases generales<sup>5</sup> (Fig. 4.2).

- Bolsillo o cráter: Esta topología es óptima para el reconocimiento de sacáridos con extremos no reductores y es encontrada en monosacaridasas como la  $\beta$ -galactosidasa y  $\beta$ -glucosidasa, entre otras, y en exopoli-sacaridasas como la glucoamilasa y  $\beta$ -amilasas. Estas exopoli-sacaridasas se han adaptado a los sustratos que tienen un gran número de terminaciones de cadena, como el almidón.
- Hendidura o guante: Esta estructura abierta permite la unión azarosa de varias unidades de azúcares de sustratos poliméricos y es comúnmente encontrada en poli-sacaridasas como la lisozima, endocelulasa,  $\alpha$ -amilasas, etc.
- Túnel: Esta topología es representada por una hendidura en la que la proteína está envuelta por muchos bucles que la cubren. Se encuentra en muchas celobiohidrolasas. El túnel formado permite a las cadenas de polisacáridos unirse a través de él.



**Fig. 4.2 Topología de los sitios activos de las glucosil-hidrolasas.** (a) Topología de bolsillo (glucoamilasa de *A. awamori*). (b) Topología de hendidura (endoglucanasa E2 de *T. fusca*). (c) Topología de túnel (celobiohidrolasas II de *T. reesei*). Los residuos catalíticos propuestos se muestran en rojo. Tomado de Davies, 1995.

La  $\alpha$ -1,6-glucosidasa de *S. cerevisiae* tiene una topología de bolsillo poco profundo, que además está delimitado por la Try158, la His280 y el asa 310-315 (Fig. 4.3), lo que podría explicar la elevada actividad hacia la isomaltosa y menor actividad, pero no nula, hacia oligosacáridos más largos<sup>9</sup>.



**Fig. 4.3 Topología del sitio activo de la  $\alpha$ -1,6-glucosidasa de *S. cerevisiae*.** En azul turquesa se muestra la "tapa" generada por la Try158, His280 y el asa 310-315. Al fondo se observa el sitio activo en verde y los residuos catalíticos: en rosa la Asp215, en púrpura el Glu277, y en azul la Asp352. (PDB 3AJ7).

### 4.2.3 MECANISMO DE HIDRÓLISIS

La hidrólisis enzimática del enlace glucosídico por las distintas variedades de glucosil-hidrolasas tiene lugar vía catálisis ácida, y está mediada por la acción de dos residuos críticos presentes en el sitio activo. En la mayoría de los casos éstos son dos residuos carboxílicos, un donador de protones y un nucleófilo/base. Esta hidrólisis puede ocurrir de dos formas distintas atendiendo a cuál sea la configuración del carbono anomérico resultante de la hidrólisis<sup>4,5</sup>:

- Inversión: en la que la configuración anomérica cambia.
- Retención: en la que la configuración anomérica se mantiene.

En las glucosidasas que operan mediante inversión, la distancia de separación de los dos carboxilos catalíticos es de aproximadamente 10 Å, mientras que en las enzimas que retienen la configuración, la separación es alrededor de 5 Å.

El mecanismo de inversión tiene lugar en una sola etapa mediante un proceso catalítico ácido-base, en donde uno de los dos residuos catalíticos opera como base, facilitando el ataque de una molécula de agua al carbono anomérico y el otro como ácido, asistiendo la separación del oxígeno (Fig. 4.4).

## Mecanismo con Inversión

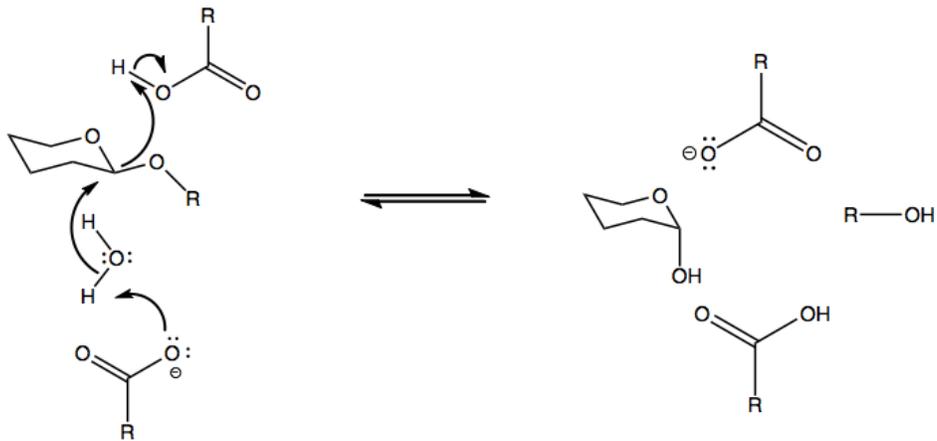
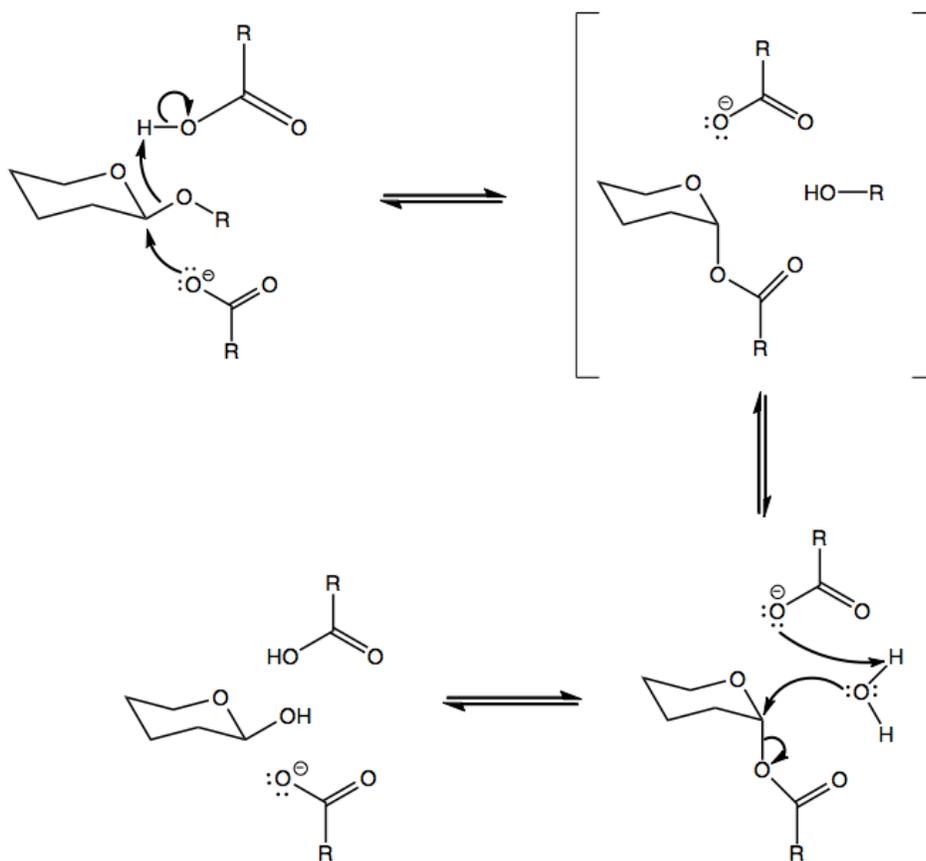


Fig. 4.4 Mecanismo de acción con inversión de la configuración anomérica.

El mecanismo de retención se lleva a cabo mediante un doble desplazamiento. En este proceso tiene lugar el ataque del residuo nucleofílico al carbono anomérico. Como resultado se genera la formación transitoria de un enlace covalente entre la enzima y el glucósido. Este enlace es lo suficientemente estable como para permitir la separación del centro activo de la parte liberada y su reemplazamiento por una molécula de agua; en este punto la asistencia de un segundo residuo catalítico ácido/base (que actúa en la primera etapa como ácido, protonando al oxígeno glucosídico) actúa como base en esta etapa, sustrayendo un protón de una molécula de agua que a su vez ataca al enlace covalente transitorio, lo rompe y regenera a la enzima (Fig. 4.5)<sup>4,5</sup>.

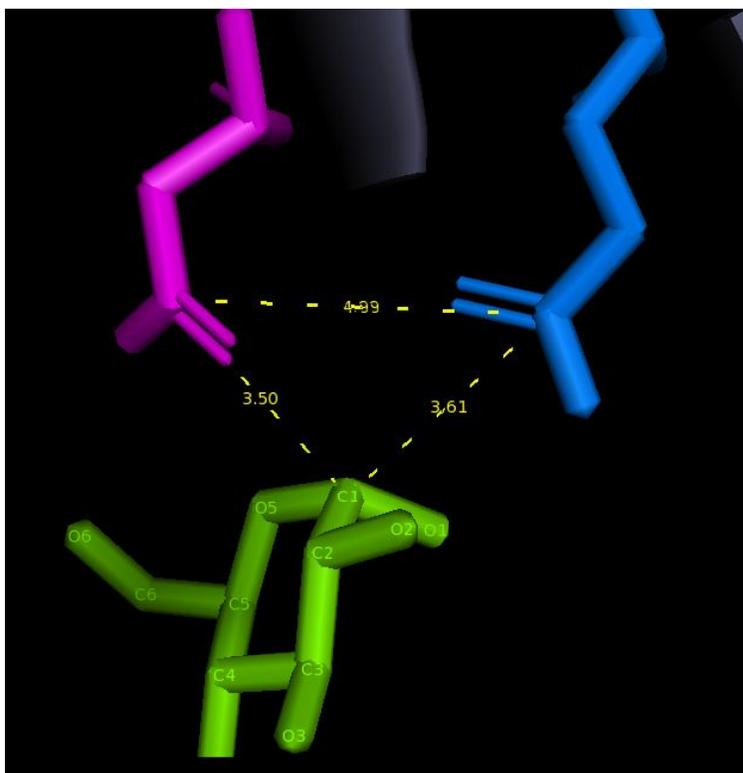
## Mecanismo con Retención



**Fig.4.5 Mecanismo de reacción con retención de la configuración anomérica.**

En los dos casos la posición del donador de protones es la misma. En el mecanismo de retención, el nucleófilo se encuentra cerca del carbono anomérico del sacárido. En el caso del mecanismo por inversión el nucleófilo se encuentra muy alejado del carbono anomérico, lo que permite la fácil intrusión de una molécula de agua promoviendo la reacción<sup>5</sup>.

En la  $\alpha$ -1,6-glucosidasa de *S. cerevisiae* el residuo nucleofílico es el Asp215, mientras que el donador de protones es el Glu277<sup>7</sup>. En la figura 2.6 se puede apreciar que entre el carbono del carbonilo del Asp215 y el carbono del carbonilo del Glu277 existe una distancia de 4.99 Å, lo que sugiere que esta enzima tiene un mecanismo por retención<sup>7</sup> (Fig. 4.6).



**Fig.4.6. Detalle de los residuos catalíticos de la  $\alpha$ -1,6-glucosidasa de *S. cerevisiae*.** Residuos catalíticos Asp215 en color rosa, Glu277 en azul y en verde residuo no hidrolizado de Glucosa. Se muestran las distancias en Å entre el carbonilo de la Asp215 y el carbonilo del Glu277, entre el carbonilo de la Asp215 y el C1 de la glucosa y entre el carbonilo del Glu277 y el C1 de la glucosa (PDB 3A4A).

### **4.3 IMPORTANCIA INDUSTRIAL Y FARMACÉUTICA DE LAS GLUCOSIL-HIDROLASAS**

Las enzimas se han convertido en moléculas insustituibles para la obtención industrial de productos de distinta índole. Las industrias más beneficiadas son las de alimentos, química y farmacéutica.

En la industria alimenticia la fabricación de pan y la producción de cerveza son ejemplo de procesos fermentativos asistidos por una levadura del género *Saccharomyces*<sup>4</sup>.

Otro ejemplo relevante se encuentra en la industria del almidón, esencial para la obtención de oligo y monosacáridos, empleados en la elaboración de distintos alimentos y como materia prima para la generación de etanol, que como combustible líquido sustitutivo de la gasolina toma fuerza. El costo del procesamiento enzimático de almidón en los Estados Unidos de Norte América es de aproximadamente \$156 millones de dólares. El equivalente de las enzimas usadas en este proceso de licuefacción,  $\alpha$ -amilasa y glucoamilasa principalmente, representa el 24% del total del costo de todo el proceso<sup>10, 4</sup>.

En el caso de las  $\alpha$ -amilasas, la ingeniería de proteínas se ha centrado en incrementar la estabilidad a la temperatura, en mantener la actividad en un rango mayor de pH y en mejorar los valores de actividad catalítica o especificidad en el proceso<sup>10</sup>.

Por otra parte, las deficiencias en las glucosil-hidrolasas son las causas más frecuentes de intolerancia a la lactosa o de un gran número de enfermedades

lisosomales de almacenamiento (LSDs) en el hombre<sup>5</sup>. Los prospectos para tratamientos de LSDs abarcan el reemplazamiento enzimático (ERT), la terapia génica, o el uso de moléculas pequeñas (chaperonas); las dos primeras son potencialmente exitosas para el tratamiento debido a que la enzima exógena gana acceso al lisosoma y logra degradar el sustrato acumulado<sup>11,12,13</sup>. En el caso de las moléculas pequeñas, estas ayudan a plegar a la enzima y alcanzar su conformación activa. Cabe destacar que únicamente se necesita del 1 al 5% de la enzima intracelular activa para corregir los defectos metabólicos causados por deficiencias enzimáticas. La noción de que las LSDs pueden ser tratadas por reemplazamiento de la enzima defectuosa con enzimas exógenas fue sugerida por primera vez por Christian de Duve en 1964<sup>13</sup>. Por el momento esta terapia se aplica sólo mediante inyecciones de un preparado de la enzima, pero su entrega no es sitio-específica.

#### **4.4 NANOACARREADORES**

La cooperación entre enzimas y células es la clave de la eficiencia de los sistemas biológicos. Los fármacos libres presentan ciertas limitantes para su aplicación, como su poca solubilidad, su limitada estabilidad, su toxicidad no deseada, o la incapacidad de atravesar las membranas celulares. Es por ello que, en el campo de la nanotecnología, se están haciendo esfuerzos para lograr mimetizar la organización natural mediante el desarrollo de dispositivos de liberación de fármacos, en forma de polímeros, nano y/o macropartículas, liposomas y micelas, entre otros<sup>14</sup>. Para la manipulación de enzimas, el contar con soportes sólidos (andamios) representa una gran ventaja. Las cápsides virales, por ejemplo, son

un excelente medio para soportar proteínas, ya que poseen una gran variedad de grupos funcionales en su superficie lo que las hace moléculas polivalentes que pueden acoplarse a múltiples ligandos e interactuar colectivamente con los sitios celulares específicos logrando atravesar las barreras celulares del huésped, característica que las hace atractivas para la construcción de ENCs (Enzyme Nano-Carriers), donde las enzimas son dispuestas dentro o fuera de la cápside viral, confiriéndoles un posicionamiento más eficiente sí se compara con la enzima libre<sup>15,16</sup>.

#### 4.4.1 VLPs

Claramente no se pueden implementar virus patógenos para el hombre por lo que para estos trabajos se han usado virus específicos de plantas, bacteriófagos y más recientemente “partículas tipo virus” (VLPs), que presentan gran especificidad<sup>15</sup>. Para la obtención de estas partículas altamente específicas y no infecciosas (carentes de material genético) las secuencias de las proteínas estructurales se insertan en plásmidos y se expresan en células adaptadas para la sobreexpresión proteica. Las quimeras virales producidas para el transporte de proteínas son usadas para el estudio terapéutico y estudio de la cinética enzimática<sup>15,16,17</sup>.

#### 4.4.2 VLPs DEL ERITROPARVOVIRUS 1 DE PRIMATE (PARVOVIRUS B19)

Dentro de la inmensa variedad de virus existentes, encontramos a los Parvovirus que se distinguen por ser pequeños (entre los virus), densos y resistentes. Como grupo, los Parvovirus tienen un diámetro que oscila entre los 18 y 28 nm, son de forma esférica y su material genético consta de una sola cadena de ADN; son virus que no cuentan con envoltura lipídica y su cápside está compuesta de entre 2 y 4 especies de proteínas<sup>18</sup>.

El B19V fue por mucho tiempo el único miembro de la familia Parvoviridae reconocido como patógeno para el hombre. Es el responsable del llamado eritema infeccioso, infectando células del linaje eritroide en la médula ósea. También se le ha relacionado con otros síntomas como las artropatías, fallas críticas en la producción de células rojas, hidropesía fetal, aborto, miocarditis o hepatitis<sup>18,19</sup>.

Las cápsides del B19V están formadas por 60 subunidades de proteína, tienen un diámetro de 26 nm y además de proteger y contener el ADN cumplen con funciones de reconocimiento, entrada a la célula, transporte intracelular y de liberación del ADN para el proceso infeccioso. Estas partículas se distinguen por ser estables en presencia de solventes orgánicos, resistir en intervalos de pH de 3 a 9 y tolerar temperaturas de 56 °C durante 60 minutos, confiriéndoles con todo esto resistencia a la inactivación. El peso molecular del virión y de las partículas vacías es de  $5.5$  a  $6.2 \times 10^6$ , y  $4.2 \times 10^6$  g/mol respectivamente. Los viriones tienen una densidad de 1.30 a 1.32 g/mL, mientras que las VLPs presentan una densidad de 1.28 g/mL en CsCl<sup>19</sup>.

La cápside de los virus nativos posee forma icosaédrica con número  $T=1$  y ejes de simetría de orden 2, 3 y 5; está formada de dos proteínas: VP1 y VP2 con pesos moleculares de 83 y 58 kDa respectivamente. Ambas proteínas son muy similares, VP2 se encuentra formando el 95% de la cápsides y difiere de VP1 en que ésta última posee una llamada región única de 277 aminoácidos en el extremo amino terminal. Esta región se localiza principalmente fuera del virión y por lo tanto es accesible a la unión a anticuerpos<sup>19,20</sup>.

Las VLPs que contienen VP1 y VP2 o solo VP2, son morfológica e inmunológicamente similares a las partículas infecciosas<sup>20</sup>. El B19V es un modelo interesante para estudios de nanotecnología y biomedicina debido a sus propiedades<sup>21</sup>:

- Es posible formar VLPs con una sola proteína (VP2, PDB 1S58).
- Esta proteína puede ser modificada en su extremo N-terminal sin perder su potencial para formar cápsides.
- Tiene gran potencial de aplicación ya que es un virus que infecta humanos.
- Dada su relativa sencillez estructural es un sistema ideal para desarrollar modelos de asociación de capsómeros.

Como antecedentes del uso de VLPs de B19V destaca la producción en baculovirus de VLPs quiméricas, modificadas en el amino terminal de la proteína VP2, presentando respuesta inmune y protección contra reto viral<sup>22</sup>. También ha sido posible obtener VLPs quiméricas recombinantes que transportan epítopos específicos del virus del dengue 2 en el extremo amino terminal de VP2<sup>23</sup>. En otro

estudio se obtuvieron VLPs que portaban epítomos del virus de la cariomeningitis linfocítica (LCMV) que al ser administradas vía intra-nasal inducen una respuesta de células T cito-tóxicas y producción de anticuerpos IgG e IgA<sup>24</sup>.

Además de epítomos pequeños, se han reportado estudios donde se producen VLPs de B19V quiméricas fusionando proteínas completas al amino terminal, como en el caso de Leona Gilbert y colaboradores, que reportan una construcción colocando la proteína verde fluorescente mejorada (EGFP). Este equipo de trabajo obtuvo VLPs muy similares en tamaño a las nativas del B19V con un promedio de 9 dominios de EGFP dispuestos en la superficie de estas partículas<sup>25</sup>.

Otro método de ensamble para la producción de VLPs es el probado por Sánchez-Rodríguez y colaboradores, quienes lograron la obtención de VLPs por ensamble *in vitro* de la proteína VP2 purificada en condiciones desnaturalizantes (GndHCl 5 M)<sup>21</sup>.

Un ejemplo de producción *in vitro* de VLPs quiméricas con proteínas completas ensambladas a la superficie es el caso de Gutiérrez-Landa y colaboradores, quienes reportaron una construcción de VLPs a partir de proteína VP2 de B19V modificada en el asa 300-314 (residuo 307) con una lipasa de *Bacillus pumillus* (BpIA), quedando así la lipasa expuesta fuera de la cápside y presentando actividad catalítica. Las partículas obtenidas fueron en tamaño poco mayores a las VLPs silvestres, como se esperaba por la presencia de la BpIA, en ensambles mixtos con una relación 4:1 de VP2:VP2Q<sup>26</sup>. Otro caso de producción *in vitro* de VLPs quiméricas es el reportado por Santillán-Uribe y colaboradores, quienes

propusieron una modificación en el asa 62-75 de VP2; esta región presenta ventajas ya que no tiene cargas o interacciones que modifiquen la capacidad de la proteína de generar VLPs, y además está expuesta en la superficie de la partícula, lo que la hace ideal para la presentación de péptidos. En este proyecto se insertó un péptido de 64 residuos de la proteína F del virus sincitial respiratorio humano (RSV): F<sub>215-278</sub>. Se obtuvieron partículas de especies mono-dispersas (por DLS) de  $21.02 \pm 4.12$  nm para partículas ensambladas con VP2-F<sub>215-278</sub>, y de  $18.54 \pm 3.54$  nm para ensamblajes de VP2:VP2-F<sub>215-278</sub> en proporción 9:1<sup>27</sup>.

#### **4.5 ENFERMEDADES LISOSOMALES DE ALMACENAMIENTO (LSDs)**

Las enfermedades lisosomales de almacenamiento (LSDs) son provocadas por errores innatos del metabolismo como: deficiencias en enzimas lisosomales (solubles que residen en el lumen de los lisosomas) o transportadoras, resultando en la acumulación de metabolitos dañinos a la célula. Juntas tienen una incidencia de un caso en siete mil nacimientos, abarcando alrededor de 50 diferentes síndromes hereditarios, fueron descritas por primera vez en 1880<sup>11,28</sup>.

Los lisosomas están presentes en todas las células nucleadas formando parte de un complejo intracelular de reciclaje involucrado en la degradación de macromoléculas. Las unidades monoméricas liberadas mediante la acción enzimática se transportan o difunden fuera de los lisosomas<sup>29</sup>. Comúnmente en todas las LSDs se acumulan macromoléculas específicas o compuestos monoméricos dentro de los orgánulos en el sistema endosoma-autófago-lisosoma<sup>30</sup>. En este proceso de degradación están involucradas aproximadamente

75 diferentes enzimas lisosomales (incluyendo glucosidasas, lipasas, proteasas, y nucleasas). Las consecuencias de la ausencia total o parcial de estas enzimas incluyen la degradación y/o el reciclaje incompletos y la acumulación de moléculas intracelulares<sup>11,29</sup>.

La edad de aparición y el espectro de síntomas exhibidos varían en las diferentes LSDs. La presentación clínica clásica de las LSDs es descrita como: enfermedad neurodegenerativa en recién nacidos o que aparece durante la infancia. Sin embargo, puede haber variantes, la severidad usualmente está asociada con la actividad enzimática residual, los fenotipos se manejan como<sup>12,30</sup>:

- Tipo infantil: es el fenotipo más severo. Típicamente con actividad enzimática nula.
- Tipo juvenil: fenotipo que presenta poca actividad enzimática residual y manifestaciones clínicas atenuadas.
- Tipo de etapa adulta: forma leve con moderada actividad enzimática residual.

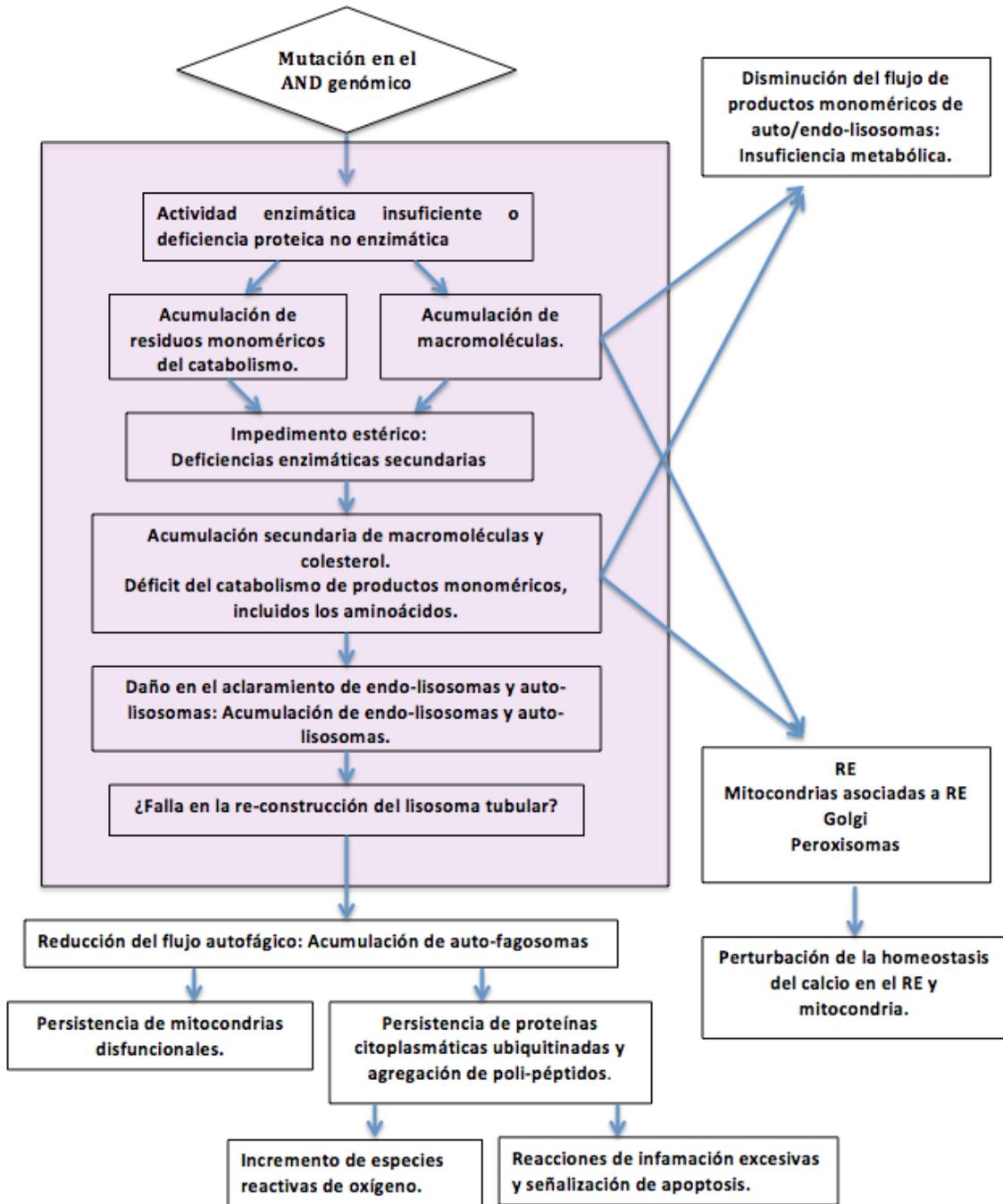
Usualmente la degradación de los tejidos es progresiva, lo que abre una ventana de oportunidades para futuras terapias. Hay varios factores que influyen en la selección de LSDs candidatas a tratamiento por terapia de reemplazamiento enzimático (ERT), estos incluyen: el sitio de la patología, la probabilidad de revertir las manifestaciones y la presencia o ausencia de la actividad enzimática residual<sup>11,13</sup>. El hecho de que existan fenotipos con gravedad que varía de leve a mortal dependiendo de la actividad catalítica residual es indicativo de no ser

necesario el restaurar en totalidad la acción enzimática, siempre y cuando la enzima llegue a los sitios apropiados para tratar la patología<sup>13</sup>.

Las LSDs pueden ser agrupadas acorde a las características bioquímicas del sustrato mayormente acumulado, principalmente se encuentran los mucopolisacáridos, esfingolípidos, glucógeno o glicoproteínas<sup>11</sup>. Una cuestión importante es entender cómo la acumulación de sustratos en el sistema endosoma-lisosoma contribuye a la patogénesis, y cómo la interpolación de este conocimiento puede mejorar los tratamientos a pacientes.

#### 4.5.1 FUNCIÓN ENDOSOMA-AUTOFAGO-LISOSOMA Y SU DISFUNCIÓN EN LSDs

Los lisosomas juegan un papel central en el proceso de eliminación y reciclaje de sustratos celulares mediante múltiples rutas incluyendo: el sistema endosoma-autofago-lisosoma<sup>30</sup>. Los lisosomas son organelos ácidos presentes en todas las células nucleadas, contienen enzimas requeridas para la degradación de macromoléculas y permeasas, que facilitan la translocación de pequeñas moléculas generadas por el catabolismo de las macromoléculas<sup>29,30</sup>. En comparación con el endosoma y los auto-fagosomas, el lisosoma, es de tamaño pequeño, altamente rico en proteínas de trans-membrana (LMPs como LAMP1 y LAMP2) y en enzimas hidrolíticas que presentan una alta densidad y un gran contenido de iones calcio y protones<sup>30</sup>.



**Fig. 4.7 Cascada hipotética de eventos en la mayoría de las enfermedades por acumulación de sustrato.** Los eventos que tienen lugar en los endo/auto-lisosomas se encuentran dentro del recuadro rosa. Mientras que los eventos ocurridos en el citoplasma y que afectan auto-fagosomas, retículo endoplásmico, aparato de Golgi, peroxisomas y mitocondrias están colocados en el fondo blanco. Tomado de Platt, 2012.

Cuando se acumulan niveles muy elevados de macromoléculas o monómeros en los endo-autolisosomas, ellos inhiben el catabolismo enzimático y el flujo de permeasas que no son genéticamente deficientes, lo que resulta en la acumulación secundaria de sustratos. Esta acumulación de sustratos primarios y secundarios pone en marcha una cascada de eventos que no solo impactan el sistema endosoma-autofago-lisosoma, sino también otros organelos y generalmente todas las funciones celulares<sup>30</sup> (Fig. 4.7).

#### 4.5.2 ENFERMEDAD DE ACUMULACIÓN DE GLUCÓGENO TIPO II/ ENFERMEDAD DE POMPE

La enfermedad de Pompe, también nombrada deficiencia de maltasa ácida o enfermedad de almacenamiento de glucógeno tipo II (GSP II), es un desorden autosómico recesivo. Es una rara enfermedad, progresiva y en ocasiones fatal debido al avance a nivel muscular. Es causada por la deficiencia de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa ácida (GAA) encargada de la degradación del glucógeno lisosomal. Esta enfermedad tiene manifestaciones clínicas que varían con respecto a la edad de aparición, progresión de la enfermedad y grado de avance en los órganos involucrados. En ella, el glucógeno lisosomal se acumula en diversos tejidos, abarcando principalmente el hueso, músculo cardíaco y músculo esquelético. Todos los pacientes con GSP II cursan con los mismos síntomas generales: debilitamiento muscular progresivo, fallo orgánico y/o muerte<sup>31</sup>.

##### 4.5.2.1 Fenotipos de la enfermedad de Pompe

Actualmente se clasifican los fenotipos de la enfermedad de Pompe como<sup>31</sup>:

- ❖ Forma infantil: Los pacientes con este fenotipo exhiben un rápido progreso caracterizado por una prominente cardiomegalia, hepatomegalia, debilidad muscular e hipotonía y finalmente la muerte causada por una falla cardiorrespiratoria antes del primer año de vida.
- ❖ Variante forma infantil: Los pacientes exhiben una lenta progresión, generalmente sin presentar la pronunciada cardiomegalia, aunque pueden presentar las características de la forma tardía durante el primer año de vida.
- ❖ Forma tardía: Se presenta después de los 3 años de vida, con manifestaciones musculares como debilidad e hipotonía, deficiencia en el desarrollo físico y generalmente no se presenta cardiomegalia severa. En muchos casos, la debilidad muscular empeora hasta llevar al paciente al uso de silla de ruedas y requerir asistencia respiratoria. La falla respiratoria es usualmente la causante de la morbilidad y mortalidad de este fenotipo<sup>31,32</sup>.
- ❖ Forma adulta: Esta caracterizada por una lenta progresión de la miopatía, atacando principalmente el músculo esquelético, impactando directamente el crecimiento. Puede manifestarse a cualquier edad.

La incidencia de todas las formas de la enfermedad de Pompe se estima en 1:40,000 casos a nivel mundial<sup>31</sup>.

En general la severidad de la enfermedad está correlacionada inversamente con la cantidad residual de  $\alpha$ -glucosidasa ácida activa. La edad de muerte varía

dependiendo de edad de comienzo de la enfermedad, de la tasa de progresión y de los órganos afectados.

#### 4.5.2.2 Diagnóstico diferencial

El diagnóstico de la enfermedad de Pompe plantea un dilema debido a lo raro de la condición y la naturaleza no específica de los fenotipos, lo que suele provocar un mal diagnóstico. Después del diagnóstico, el intervalo para el seguimiento clínico se individualiza dependiendo del paciente y el fenotipo que presente (Cuadro. 4.2 y Cuadro. 4.3)<sup>31</sup>.

Cuadro. 4.2 Diagnósticos diferenciales similares a la Enfermedad de Pompe en su forma infantil. Tomado de Kishnani. et al, 2006.

<b>Diagnóstico diferencial</b>	<b>Signos y síntomas compartidos</b>
<b>Enfermedad aguda de Werdnig-Hoffman (Atrofia musculoespinal I).</b>	Hipotonía, miopatía proximal progresiva, ausencia de reflejos.
<b>Hipotiroidismo.</b>	Hipotonía, macroglosia
<b>Fibroelastosis endocárdica.</b>	Disnea, dificultades al tragar, cardiomegalia, fallo cardíaco.
<b>Miocarditis.</b>	Cardiomegalia.
<b>Distrofia muscular congénita.</b>	Hipotonía severa y debilidad muscular.
<b>Enfermedad de acumulación de glucógeno tipo IIIa (Enfermedad de Cori-Forbes) y Enfermedad de acumulación de glucógeno IV (Enfermedad de Anderson).</b>	Cardiomegalia, miopatía, elevación de la creatina fosfo-cinasa (CK).
<b>Desordenes de cadena respiratoria (mitocondria).</b>	Hepatomegalia, debilidad muscular, elevación de la creatina fosfo-cinasa (CK).
<b>Cardiopatía idiopática hipertrófica.</b>	Hipertrofia biventricular.
<b>Desordenes en peroxisomas.</b>	Hipotonía, hepatomegalia.
<b>Enfermedad de Danon</b>	Cardiomegalia, cardiopatía, almacenamiento lisosomal de glucógeno.

Una radiografía de pecho y un electrocardiograma (EKG) son buenas opciones en el diagnóstico para la forma infantil de la enfermedad; y el ecocardiograma para la

siguiente etapa. En etapas posteriores los pacientes presentan invariablemente problemas en la función cardíaca y progresión de la cardiomiopatía<sup>31</sup>.

Cuadro. 4.3 Diagnósticos diferenciales similares a la Enfermedad de Pompe en su forma tardía. Tomada de Kishnani. et al, 2006.

Diagnóstico diferencial	Signos y síntomas compartidos
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Distrofia muscular de cintura pélvica (LGMD).</b></li> <li>• <b>Distrofia muscular de Becker (BMD).</b></li> </ul>	<p>Debilidad muscular progresiva en pelvis, piernas y hombros.</p> <p>Debilidad progresiva de los músculos proximales, insuficiencia respiratoria, dificultad al caminar, elevación de la creatina cinasa (CK).</p>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Síndromes escapulo-perineales.</b></li> <li>• <b>Síndrome de espina rígida.</b></li> </ul>	<p>Debilidad muscular progresiva principalmente en rodillas y hombros.</p> <p>Columna espinal rígida, dolor de espalda baja.</p>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Polimiositis.</b></li> <li>• <b>Enfermedad de acumulación de glucógeno: IIIa (enfermedad de Cori-Forbes); IV (enfermedad de Anverso); V (enfermedad de McCardle); y VII (enfermedad de Tauri).</b></li> </ul>	<p>Debilidad muscular inexplicable.</p> <p>Hipotonía, hepatomegalia, debilidad muscular, elevación de a creatina cinasa (CK).</p>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Enfermedad de Danon</b></li> </ul>	<p>Cardiomiopatía hipertrófica, miopatía de musculo esquelético, acumulación de vacuolas de glucógeno.</p>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Artritis reumatoide</b></li> <li>• <b>Miopatías mitocondriales</b></li> </ul>	<p>Rigidez/dolor al realizar esfuerzos.</p> <p>Hipotonía, hepatomegalia. Algunas formas cursan con cardiomiopatía hipertrófica, debilidad muscular, elevación de la creatina cinasa (CK).</p>

Dentro de los estudios sanguíneos se incluyen la creatinina fosfo-cinasa sérica (CK); la elevación de esta enzima es notoria, sin embargo, no es nada específica como marcador de la enfermedad de Pompe. Enzimas séricas como la aspartato amino-transferasa (AST), la alanina amino-transferasa (ALT) o lactato deshidrogenasa (LDH) se elevan y son reflejo de enzimas liberadas por el musculo afectado<sup>31</sup>.

Existe una creciente evidencia del valor de un tetra-sacárido específico de glucosa en la orina y en suero [Glc4 (Glc  $\alpha$ 1-6-Glc $\alpha$ 1-4-Glc $\alpha$ 1-4Glc)] que representaría una forma más específica en la evaluación de la enfermedad de Pompe, ya que aunque este tetra-sacárido puede estar elevado en otras enfermedades de acumulación de glucógeno, los niveles más elevados los presenta la GSD II (Cuadro. 4.4 y Cuadro 4.5)<sup>31, 33</sup>.

Para las formas tardías de la enfermedad se utilizan estudios para medir la actividad muscular (estudios de conducción nerviosa, histoquímica, biopsia para histología, etc.). Tanto para la forma infantil como la tardía los estudios de función pulmonar sirven para identificar el compromiso respiratorio<sup>31</sup>.

El diagnóstico clínico es tradicionalmente confirmado por la ausencia virtual (en la forma infantil) o marcadamente reducida (forma tardía) de la actividad enzimática de la GAA en cultivos de fibroblastos tomados de biopsia de piel, músculo, purificado de linfocitos, células mononucleares o líneas celulares linfáticas<sup>31</sup>.

Nuevos métodos se han desarrollado para estudiar la actividad de la GAA en manchas de sangre seca (DBS) por sus siglas en inglés: dried blood spot, método no invasivo, económico y 100% específico para la corroboración de la enfermedad de Pompe en la etapa infantil (Cuadro. 4.6)<sup>34</sup>.

## 4.5 ENFERMEDADES LISOSOMALES DE ALMACENAMIENTO (LSDs)

Cuadro. 4.4 Niveles en orina del Glc<sub>4</sub> en pacientes con LSDs. Tomado de An. Y. et al, 2000.

Estado	Edad (años)	Glu <sub>4</sub> (mol/mol Cr <sup>a</sup> )	Rangos normales (mol/mol Cr <sup>a</sup> )
GSD II	<1	34.4	8.9± 8.2
GSD II	<1	45.5	
GSD II	<1	45.6	
GSD II	<1	31.5	
GSD II	<1	17.6	
GSD II	<1	33.1	
GSD II	2	54.7	3.6± 3.8
GSD II	3	52.2	
GSD II	4	27.2	
GSD II	4	92.8	
GSD II	5	73.4	2.0± 2.1
GSD II	11	31.0	0.9± 1.0
GSD II	20	33.0	0.4± 0.3
GSD II	31	25.0	
GSD II	40	2.2	
GSD II	45	4.8	
GSD II	45	8.8	
GSD II	61	6.5	
GSD I	<1	<1	8.9± 8.2
GSD Ia	2	4.8	3.6± 3.8
GSD I	4	4.0	
GSD Ia	6	4.8	2.0± 2.1
GSD Ia	7	0.7	
GSD Ib	19	0.8	0.9± 1.0
GSD I	47	1.3	0.4± 0.3
GSD IIIa	1	33.3	3.6± 3.8
GSD IIIa	2	63.2	
GSD IIIa	4	18.2	
GSD III	5	97.6	
GD IIIb	9	23.9	2.0± 2.1
GSD IIIa	28	4.8	0.4± 0.3
GSD III	29	1.8	
GSD IIIb	46	2.1	

## 4.5 ENFERMEDADES LISOSOMALES DE ALMACENAMIENTO (LSDs)

Cuadro. 4.5 Niveles en suero de Glc<sub>4</sub> en pacientes con LSDs. Tomado de An. Y. et al, 2000.

<b>Estado</b>	<b>Edad (años)</b>	<b>Glc<sub>4</sub> (nmol/mL)</b>	<b>Rango normal (nmol/mL)</b>
<b>GSD II</b>	<1	1.1	0.30± 0.39
<b>GSD II</b>	<1	1.8	
<b>GSD II</b>	<1	1.7	
<b>GSD II</b>	<1	7.2	
<b>GSD II</b>	<1	3.4	
<b>GSD II</b>	<1	3.0	
<b>GSD II</b>	2	1.3	0.22± 0.15
<b>GSD II</b>	2	3.2	
<b>GSD II</b>	3	2.2	
<b>GSD II</b>	4	0.8	
<b>GSD II</b>	4	3.2	
<b>GSD II</b>	5	0.6	0.22± 0.16
<b>GSD II</b>	20	1.3	0.12± 0.09
<b>GSD II</b>	31	1.0	
<b>GSD II</b>	40	0.2	
<b>GSD II</b>	44	1.0	
<b>GSD II</b>	45	0.3	
<b>GSD II</b>	45	0.3	
<b>GSD II</b>	61	0.1	
<b>GSD I</b>	<1	0.6	0.30± 0.39
<b>GSD Ia</b>	2	0.3	0.22± 0.15
<b>GSD Ia</b>	3	0.4	
<b>GSD I</b>	4	0.3	
<b>GSD Ia</b>	6	0.5	0.22± 0.15
<b>GSD Ia</b>	7	0.5	
<b>GSD Ia</b>	38	0.4	0.12± 0.09
<b>GSD I</b>	47	0.3	
<b>GSD IIIa</b>	1	2.5	0.22± 0.15
<b>GSD IIIa</b>	2	0.6	
<b>GSD III</b>	9	1.8	0.22± 0.15
<b>GSD III</b>	46	1.0	0.12± 0.09

El aislamiento de GAA de extractos de DBS por inmuno-captura o la inhibición competitiva de la maltasa-glucoamilasa (MGA) usando maltosa o sacarbosa son

métodos usados para eliminar la interferencia de la actividad de MGA. Los DBS son convenientemente colectados por punción capilar del talón o dedo y ofrecen la ventaja de poder ser transportados fácilmente por largas distancias sin dañar la integridad de la muestra<sup>31</sup>.

Cuadro. 4.6 Actividad de la GAA en manchas de sangre seca de controles, individuos con enfermedad de Pompe e individuos heterocigotos. Tomado de Umapathysivam. K, 2001.

Desorden	Etapas de la vida	Concentración proteica (µg/L)	Actividad enzimática (µmol * h <sup>-1</sup> * L <sup>-1</sup> )
Control: Recién nacido (n=96)		75.9 <sup>a</sup> (26-196)	3.5 <sup>a</sup> (0.3-10)
Control: Jóvenes (n=12)		23.4 <sup>a</sup> (16.6-44.5)	0.8 <sup>a</sup> (0.4-2.5)
Control: Adultos (n=215)		31.7 <sup>a</sup> (8.1-65)	1.3 <sup>a</sup> (0.3-3.0)
Heterocigoto	Adulto <sup>b</sup>	13.6	0.65
Heterocigoto	Adulto <sup>b</sup>	10.5	0.47
Heterocigoto	Adulto <sup>b</sup>	16.6	0.74
Pompe	Infante	36.6	0
Pompe	Joven	10.1	0
Pompe	Joven	0	0
Pompe	Joven	0	0
Pompe	Adulto	0.6	0
Pompe	Adulto	0	0
Pompe	Adulto	0	0
Pompe	Adulto	0	0
Pompe	Adulto	0.8	0
Pompe	Adulto	0	0
Pompe	Adulto	1.9	0
Pompe	Adulto	0	0
Pompe	Adulto	0	0
Pompe	Adulto	0.6	0.04
Pompe	Adulto	0.04	0
Pompe	Adulto	2.0	0
Pompe	Adulto	7.2	0

<sup>a</sup> Mediana (rango) para población de recién nacidos, jóvenes y adultos

<sup>b</sup> Muestras de sangre tomadas a adultos heterocigotos.

### 4.5.3 ENFERMEDAD DE ACUMULACIÓN DE GLUCÓGENO TIPO III/ ENFERMEDAD DE CORI-FORBES

En 1952 Bárbara Illingworth y Gerty Cori descubrieron cantidades excesivas de una estructura anormal de glucógeno en hígado y músculo de pacientes que Gilbert Forbes seguía clínicamente. La enfermedad de acumulación de glucógeno tipo III es una enfermedad rara con manifestaciones clínicas variables. Es causada por la deficiencia de la enzima des-ramificadora de glucógeno (amilo-1,6-glucosidasa)<sup>35</sup>.

Los individuos con GSD tipo III presentan hepatomegalia, hipoglucemia, hiperlipidemia y retraso en el crecimiento. Es una enfermedad autosómica recesiva que se ha encontrado en diferentes grupos étnicos, incluyendo caucásicos, africanos, hispanos y asiáticos<sup>35</sup>.

#### 4.5.3.1 Fenotipos de la enfermedad de Cori-Forbes

La enzima des-ramificadora de glucógeno (amilo-1,6-glucosidasa) humana es una de las pocas proteínas que presentan dos actividades enzimáticas independientes (transferasa e hidrolasa) que son requeridas para la completa degradación del glucógeno. Dependiendo de la función faltante y del grado de ausencia de la actividad catalítica es como se clasifica esta enfermedad<sup>35</sup>:

- Tipo IIIa: Se presenta en la mayoría de los casos reportados de GSD-III viéndose afectados tanto hígado como músculo (esquelético y cardíaco) por la ausencia parcial o total de ambas acciones catalíticas.

- Tipo IIIb: Aproximadamente el 15% de los pacientes con GSD-III presentan este fenotipo caracterizado por presentar únicamente problemas a nivel hepático, viéndose afectadas ambas actividades enzimáticas.
- Tipo IIIc: La incidencia de este fenotipo es muy poca, en éste se ve afectado únicamente el hígado por la deficiencia de la actividad transferasa de la enzima.
- Tipo III d: Fenotipo en el que se ven afectados tanto hígado como músculo por la deficiencia en la actividad hidrolítica (des-ramificadora) de la enzima.

Durante la infancia y la niñez las características dominantes son hepatomegalia, hipoglucemia, hiperlipidemia y retraso en el crecimiento. En individuos con los músculos involucrados, la miopatía y cardiomiopatía es variable. La hepatomegalia y síntomas hepáticos en algunos casos disminuyen con la edad y usualmente se resuelven después de la pubertad, probablemente por la reducción relativa de los requerimientos de glucosa. Sin embargo, hay casos en el que el decrecimiento en el tamaño del hígado llega a ocultar el progreso de la cirrosis hepática y el fallo hepático ocurre. En muchos de los casos se desarrolla la última etapa de cirrosis hepática y en otros tantos puede llegar a presentarse carcinomas hepáticos<sup>35</sup>.

#### 4.5.3.2 Confirmación diagnóstica

La enfermedad de Cori-Forbes presenta síntomas variables dependiendo de los órganos involucrados y de la actividad catalítica residual que presenten los pacientes. Esto resulta en un extensivo y complicado diagnóstico (Cuadro. 4.7)<sup>35</sup>.

Un electromiograma y estudios de conducción nerviosa son útiles para detectar alteraciones musculares y sus grados de avance. Las biopsias de hígado y músculo ayudan a discernir la causa de la hepatomegalia y/o miopatía, en la biopsia se encuentran vacuolas saturadas de glucógeno localizadas en el citoplasma<sup>35</sup>.

Cuadro. 4.7 Diagnóstico diferencial para la enfermedad de Cori-Forbes. Tomado de Kishnani et al. 2010.

<b>Desorden</b>	<b>Similitudes con GSD III</b>	<b>Características diferenciales</b>
<b>GSD tipo 0 (Deficiencia de la glucógeno sintasa)</b>	Rápida hipoglucemia y cetosis	Ausencia de hepatomegalia
<b>GSD tipo I (Deficiencia de la glucosa-6-fosfatasa)</b>	Severa hipoglucemia e hiperlipidemia	Incremento del ácido úrico, lactato, carencia de niveles elevados de cetonas, nefromegalia, carencia de síntomas en músculo
<b>GSD II (Deficiencia de alfa glucosidasa ácida)</b>	Miopatía, incremento de los niveles de CK, AST y ALT	Ausencia de síntomas en hígado, AST usualmente más elevada que la ALT, compromiso del diafragma, miopatía proximal con evolución a la parte distal conforme avanza la enfermedad, y lisosomas con glucógeno en histología.
<b>GSD IV (Presentación hepática; deficiencia de enzima ramificadora)</b>	Hepatomegalia, incremento de los niveles de AST y ALT	Falta de hipoglucemia en la fase final de la enfermedad hepática, acumulación de poliglucosán en biopsia de músculo.
<b>GSD IV (Presentación neuromuscular; deficiencia de enzima ramificadora)</b>	Incremento de CK, miopatía	Hipotonía, inclusiones de amilopectina, atrofia muscular, insuficiencia respiratoria, y en ocasiones cardiopatía o neuropatías involucradas
<b>GSD V Y VII</b>	Acumulación de glucógeno en músculo, incremento de CK	Síntomas dinámicos de las contracciones musculares
<b>GSD tipo VI (deficiencia de fosforilasa)</b>	Hepatomegalia, incremento de los niveles de AST y ALT,	Falta de compromiso muscular, usualmente sin

<b>GSD tipo IX (deficiencia de fosforilasa cinasa, forma hepática)</b>	hipoglucemia Hepatomegalia, incremento de niveles de AST y ALT, hipoglucemia e incremento de CK	síntomas severos Esta forma no tiene gran severidad en comparación con otras formas hepáticas (variante de gamma2 y AR) que pueden progresar mas rápido, los síntomas varían dependiendo de sus formas.
<b>Desordenes en el metabolismo de fructosa (intolerancia a la fructosa hereditaria)</b>	Hepatomegalia, aumento en los niveles de AST y ALT	Los síntomas gastrointestinales se extienden a hígado y riñones en poco tiempo, hipoalbuminemia, incremento de la bilirrubina, y disfunción del túbulo proximal, hipoglucemia provocada por la fructosa intancta
<b>GSD tipo XI (deficiencia de GLut-2)</b>	Hepatomegalia, incremento en los niveles de AST y ALT, hipoglucemia	Síntomas gastrointestinales, renales como la acidosis tubular
<b>Desordenes de gluconeogénesis (ej. Deficiencia de fructosa-1,6-bifosfatasa)</b>	Hepatomegalia, incremento de los niveles de AST y ALT, hipoglucemia	Elevación del lactato
<b>Enfermedades primarias del hígado (hepatitis, alpha-1-antitripsina)</b>	Hepatomegalia, incremento de los niveles de AST y ALT	Ausencia de hipoglucemia y cetosis
<b>Otros desordenes metabólicos (enfermedad de Gaucher o Niemann Pick B)</b>	Hepatomegalia, retraso en el crecimiento e hiperlipidemia	Presencia significativa de esplenomegalia, ausencia de hipoglucemia, presencia de acumulación celular características de estas enfermedades

El diagnóstico de la GSD III se realiza demostrando, en biopsias de hígado o músculo, cantidades excesivas y estructuras anormales de glucógeno y una deficiente actividad enzimática des-ramificadora o en la identificación de mutaciones patogénicas en el gen AGL (codifica para la enzima des-ramificadora) en ambos alelos<sup>35</sup>.

Con lo expuesto anteriormente se planteó el siguiente problema de investigación.

## 5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La utilización de VLPs como nano-acarreadores podría permitir la internalización selectiva de enzimas estabilizadas al sistema endosoma-lisosoma. Sin embargo, la formación de los nano-acarreadores requiere de ciertas condiciones de ensamble, que podrían, no ser compatibles con el plegamiento de las enzimas que se desea acarrear. Nuestro grupo de trabajo se ha planteado explorar la presentación de enzimas en la superficie de VLPs de B19V para utilizarlas como nano-acarreadores dirigidos al sistema endosoma-lisosoma. En este trabajo propusimos estudiar una quimera de la  $\alpha$ -1,6-glucosidasa de *S. cerevisiae* como modelo de enzima que podría ser introducida al sistema endosoma-lisosoma para tratar enfermedades como la de Pompe o Cori-Forbes.

El problema más importante en este trabajo es que durante el ensamble de las VLPs, las proteínas participantes se someten a condiciones desnaturalizantes. Por lo que se exploraron las condiciones de re-plegamiento de la enzima, evaluando si es posible replegarla en las mismas condiciones en que se ensamblan las VLPs del B19V.

## 6. HIPÓTESIS

Sí la quimera de la  $\alpha$ -1,6-glucosidasa de *S. cerevisiae*, expresada en *E. coli*, puede ser re-plegada en las mismas condiciones en que se pliegan y ensamblan las VLPs de B19V, esto nos permitiría producir VLPs con esta enzima desplegada en su superficie.

## 7. OBJETIVOS

### 7.1 GENERAL

- Estudiar la capacidad de re-plegamiento *in vitro* de una quimera de la  $\alpha$ -1,6-glucosidasa de *S. cerevisiae* recombinante.

### 7.2 PARTICULARES

- Transformar células de *E. coli* BL21(DE3) con el plásmido de la quimera de la  $\alpha$ -1,6-glucosidasa de *S. cerevisiae*.
- Sobre-expresar y purificar la enzima recombinante.
- Caracterizar la cinética de la enzima con un sustrato cromogénico.
- Realizar pruebas de actividad catalítica sobre almidón y glucógeno en condiciones *ex-vivo* y tipo lisosoma.
- Realizar el re-plegamiento de la enzima después de desnaturalizarla por completo y comprobar que persiste la actividad catalítica.
-

## 8. MATERIAL Y MÉTODO

### 8.1 MATERIAL BIOLÓGICO

**Células de *E. coli* cepa BL21(DE3)** genotipo BF *ompT gal DCM lon HSDS<sub>B</sub> (r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>)* λ (DE3 [ *lacI lacUV5 - T7p07 ind1 sam7 nin5* ]) [ *malB<sup>+</sup>* ]<sub>K-12</sub> (λ<sup>S</sup>)

**Plásmido pET22b(+)** con la secuencia de la quimera de la α-1,6-glucosidasa de *S. cerevisiae*.

**Enzimas de restricción:** *NdeI* y *XhoI*

### 8.2 MEDIOS DE CULTIVO

**Medio SOC:** 2% de triptona, 0,5% de extracto de levadura, 10 mM de NaCl, 2,5 mM de KCl, 10 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10 mM de MgSO<sub>4</sub> y 20 mM de glucosa)

**Agar LB con ampicilina:** 100 mg/L ampicilina, 10 g/L peptona de caseína, 5 mg/L extracto de levadura, 9 g/L NaCl, 1 g/L HNa<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25 g/L agar. pH 7.2 ± 0.2.

### 8.3 AMORTIGUADORES

**Amortiguador 1 para obtención de plásmido:** 50 mM glucosa, 25 mM Tris-HCl, pH 8, 10 mM EDTA y 10 mg/mL de lisozima

**Amortiguador 2 para obtención de plásmido:** 0.2 M NaOH y 4% SDS

**Amortiguador 3 para obtención de plásmido:** 5 M Acetato de Potasio pH 5

**Amortiguador TE 10x:** 100 mM Tris-Cl, pH 8, 10 mM EDTA

**Amortiguador NEB 3.1:** 100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 µg/mL BSA, pH 7.0

**Amortiguador TAE:** 4.28 g/L Tris-base, 1.14 mL/L Ác. acético glacial, 0.37 g/L EDTA

**Amortiguador LAMELI:** 3 g/L Tris-HCl, 14.4 g/L glicina, 0.1% SDS pH 6.8

**Amortiguador de lisis:** NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50mM, NaCl 0.3M pH 6.3

**Amortiguador de elución:** KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 35 mM, NaCl 0.3 M, Imidazol 5, 75, 130 y 275 mM pH 7.0

**Amortiguador de Fosfatos:** KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, NaCl 0.3 M, pH 7

#### 8.4 REACTIVOS QUÍMICOS

Fenol saturado de amortiguador SIGMA	Cloroformo
2-Propanol	Etanol al 80%
Geles de Agarosa	Marcador de PM 2log DNA Ladder BisLabs
Marcador de PM (Prestainer Protein Ladder)	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG)
Dodecil sulfato sódico (SDS 10%)	Mercaptoetanol
Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)	Glicerol
Azul de bromo-fenol	Bromuro de etidio
Resina Ni-TED	Geles de poliacrilamida
Urea	Cloruro de Guanidinio (GndHCl)
Ácido bicinconínico (BCA) y CuSO <sub>4</sub>	Solución reveladora de azúcares (Timol y H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )
Almidón Soluble	Glucógeno de ostra
Placas cromatográficas de sílice gel	4-nitrofenol

---

Albúmina sérica bovina (BSA)	
4-nitofenil- $\alpha$ -glucopiranosido (pNPG)	Glucosa

Membrana para diálisis

---

---

---

---

### 8.5 EQUIPOS

---

---

Electroporador

Thermomixer

Incubadora

Cámaras para electroforesis

Parrilla de calentamiento y agitación

Agitador rotatorio Stewart

Sonicador

Centrifuga Eppendorf

Concentrador de vacío Speed Vac S110

Centrifuga Sorvall RC 6+

Trans-iluminador UV

---

---

---

---

### 8.6 INSTRUMENTOS

---

---

Espectrofotómetro (CARY y Libra  
Biochrome)

Potenciómetro

Fluorómetro ISS

Balanza analítica

Balanza granataria digital

Balanza de dos platos

HPLC

---

---

---



---

## 8.7 MATERIAL

---



---

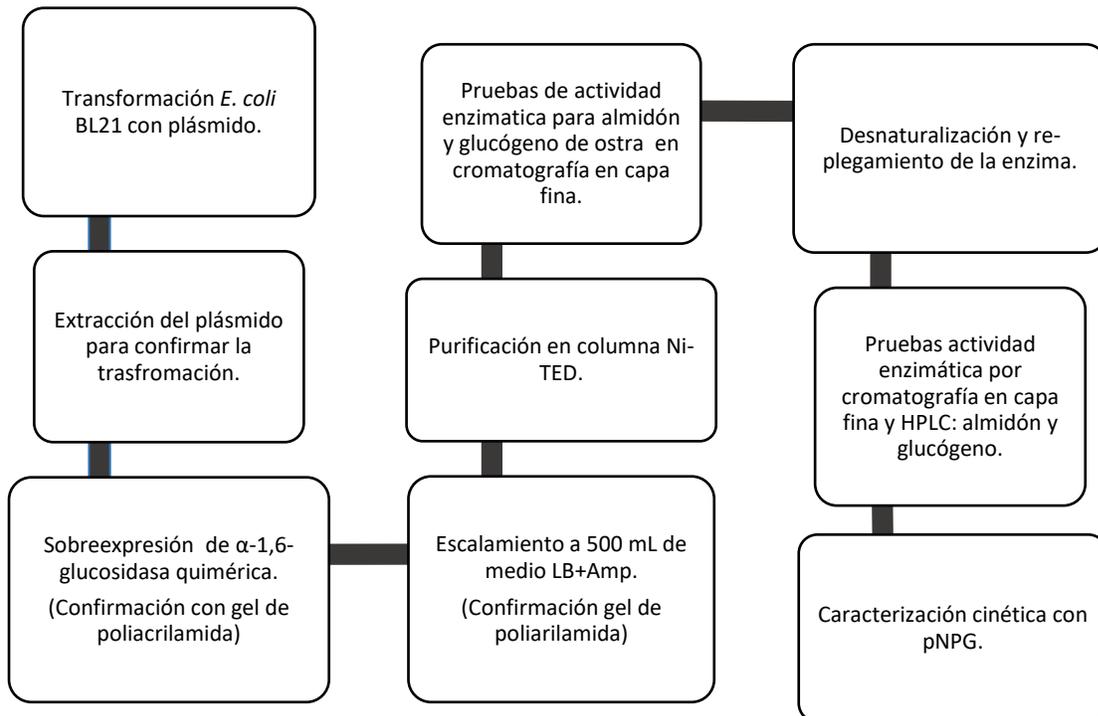
Tubos Falcón	Celdas de cuarzo
Tubos Eppendorf	Celdas desechables para espectrofotómetro
Tubos de ensayo	Vasos precipitados diferentes tamaños
Probetas	Matraz Erlen-Meyer con baffles (50, 100, 500 y 1000 mL)
Pipetas de transferencia	Centricones corte de 50 kDa
Cámaras de elución para cromatografía en capa fina	Filtros millipore 0.45µm
Celdas para electroporación	

---



---

## 8.8 . ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO



### 8.8.1 TRANSFORMACIÓN DE *E. coli* CEPA BL21(DE3)

El proceso de transformación incluye la introducción de ADN o ARN exógeno en las células bacterianas, éste pasa entonces a ser parte del material genético de la bacteria. Para permitir la entrada del plásmido a las células bacterianas, éstas deben presentar condiciones fisiológicas especiales (con membrana permeable o libre de iones), estado llamado: competencia. En este estado se alteran la permeabilidad de la pared celular para permitir la entrada del ADN exógeno a través de la membrana.

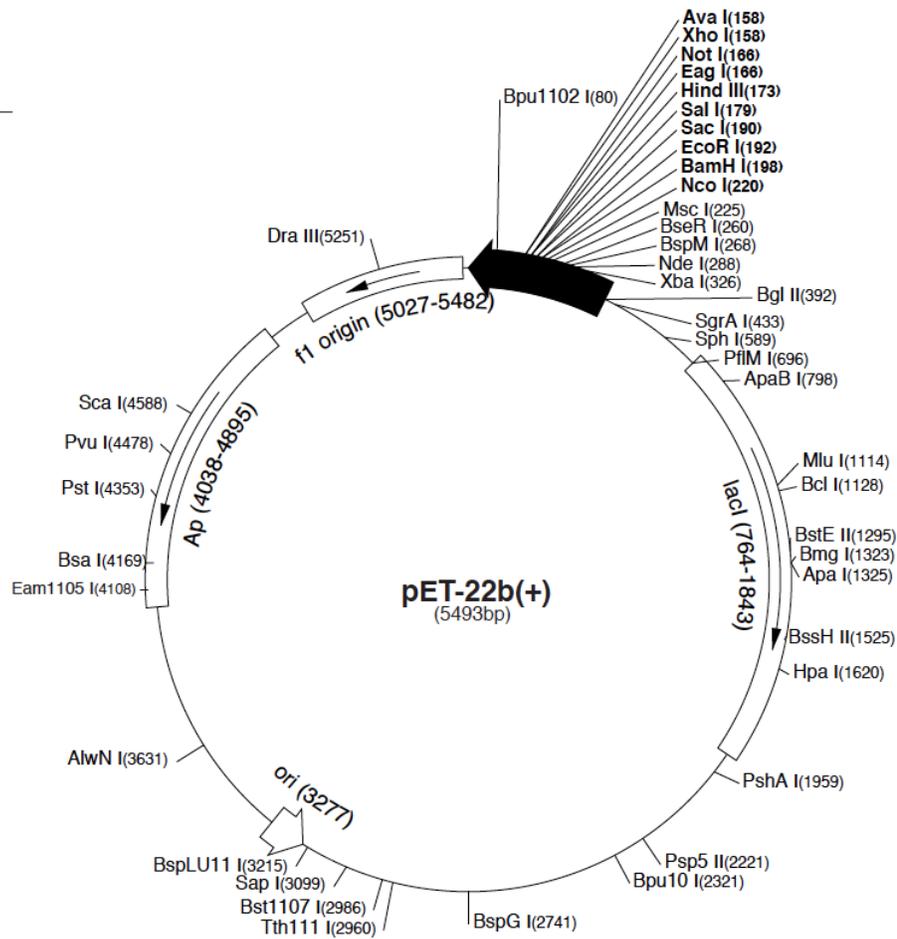


Fig 8.1 Vector de clonación pET22b(+).

El plásmido utilizado fue el pET22b(+) usado como vector para expresar el gen de la enzima, localizado entre los sitios de restricción *Nde*I y *Xho*I. Algunas características importantes que tiene este vector de 5,493 pb es que tiene el promotor del fago T7, un operador lac, una secuencia de unión al ribosoma y el codón de inicio seguido de un conector, que permite, sin romper el marco de lectura, insertar la secuencia del gen que se pretende expresar fusionada a la secuencia que codifica para 6 residuos de histidina en el extremo C-terminal. Además contiene un gen de  $\beta$ -lactamasa que confiere resistencia a la ampicilina. El plásmido fue comprado ya con las condiciones citadas.

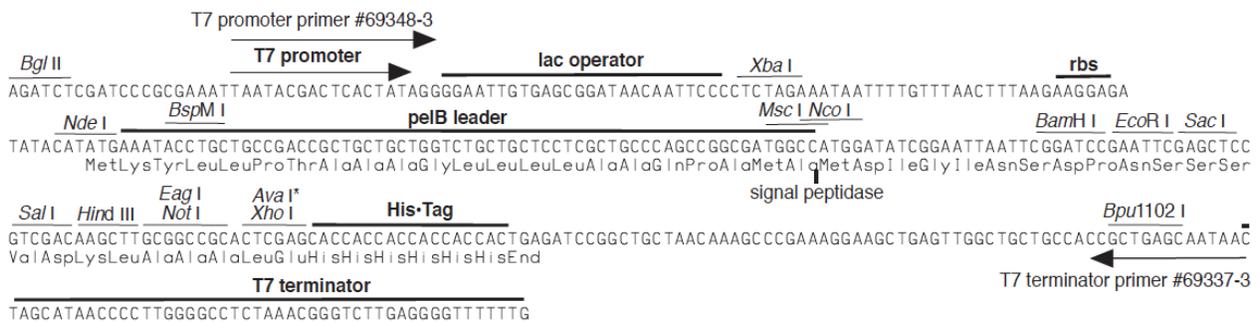


Fig 8.2 Región de clonación/expresión del vector pET22b(+)

### Protocolo

1. Se disolvió el plásmido (porción del papel filtro impregnado con plásmido) en 20  $\mu$ L de agua desionizada.
2. Se adicionaron 5  $\mu$ L de esta solución a las células competentes. Posteriormente se colocaron en una celda de electroporación fría.
3. A continuación se procedió con el pulso eléctrico, colocando la celda en el equipo electroporador (Gene pulser II, BIO-RAD) con las siguientes condiciones: 2.5 Kv en aproximadamente 5 ms.

- 
4. Aún en la celda se añadieron 500  $\mu\text{L}$  de medio SOC.
  5. Se decantó la solución de medio a un Eppendorf estéril y se incubaron por 1 h a 37 °C.
  6. Se tomaron 50  $\mu\text{L}$  de las células y se sembraron en cajas Petri con agar LB + ampicilina, usando perlas estériles.
  7. Se incubaron a 37 °C por 16 h.
  8. De las colonias aisladas se tomó una asada para inocular en un tubo con medio LB + amp líquido. La caja se resguardó a -4 °C para detener el crecimiento.
  9. El tubo inoculado se incubó 16 h a 37 °C. Este tubo inoculado se usó para el primer punto del procedimiento de purificación de plásmido.
- 

### 8.8.2 PURIFICACIÓN DEL PLÁSMIDO

El gen utilizado está conformado por la secuencia de la  $\alpha$ -1,6-glucosidasa de *S. cerevisiae*, seguido por una serie de glicinas y serinas que serán el sitio que servirá como unión con la VP2 del B19V. Y finalmente de una etiqueta de seis histidinas que servirán para la purificación por afinidad. A esto llamaremos  $\alpha$ -GI-L6H.



**Fig 8.3 Representación del gen diseñado para los experimentos ( $\alpha$ -GI-L6H):** en rosa la secuencia de la  $\alpha$ -1,6-glucosidasa de *S. cerevisiae*; en azul el ligando que servirá como sitio de unión compuesto de glicinas y serinas y en amarillo la etiqueta de histidinas.

El plásmido de las colonias transformadas se purificó para corroborar que el gen de la  $\alpha$ -GI-L6H (Fig. 8.3) estuviera presente en las colonias. La purificación se llevó a cabo por el método de fenol-cloroformo.

---

### Protocolo

---

1. Se centrifugaron las células a 5000 rpm/5 min a 20 °C.
  2. Se decantó el medio, el botón celular se resuspendió en 100  $\mu\text{L}$  de
-

- 
- amortiguador 1.
  3. Se incubó a 37 °C por aproximadamente 40 min. (Hasta observar una separación de fases).
  4. A la mezcla se agregaron 200 µL de amortiguador 2, se agitó ligeramente y se incubó en hielo por 10 min.
  5. Se agregaron 150 µL de amortiguador 3, se agitó y dejó incubar en hielo 10 min.
  6. Se centrifugó a 14,000 rpm/5 min a 18 °C.
  7. Se recolectó el sobrenadante en otro Eppendorf al que se agregó la mitad del volumen total de fenol.
  8. Se adicionó el mismo volumen de cloroformo.
  9. Se centrifugó a 14,000 rpm/5 min a 18 °C.
  10. Se trasvasó la fase acuosa a otro Eppendorf y se adicionó el mismo volumen de isopropanol frío.
  11. Se centrifugó a 14,000 rpm/15 min a 18 °C.
  12. Se realizaron lavados con etanol al 80%, centrifugando entre lavado a 14,000 rpm por 1 min hasta que dejó de oler a fenol o cloroformo.
  13. Se decantó y dejó secar el botón de plásmido obtenido.
- 

### 8.8.3 DIGESTIÓN DEL PLÁSMIDO PURIFICADO

El plásmido se sometió a una digestión con las enzimas *NdeI* y *XhoI* debido a que en el vector (pET22b(+)) el gen de la  $\alpha$ -GI-L6H fue clonado entre estos sitios de restricción. En el Cuadro 8.1 se muestran las condiciones para la digestión.

**Tabla 8.1** Mezcla para la digestión del plásmido purificado.

Reactivos	Volumen (µL)
Enzima de restricción <i>NdeI</i>	1.5
Enzimas de restricción <i>XhoI</i>	2.5
Amortiguador 3.1	3
Agua desionizada	24
Albúmina (0.1 mg/mL)	0.3

---

---

---

### Protocolo

---

---

1. Se resuspendió el botón del plásmido en 25  $\mu\text{L}$  de amortiguador TE.
  2. A 1  $\mu\text{L}$  de esta solución se añadieron 4  $\mu\text{L}$  de la mezcla de digestión.
  3. Se incubó a 37 °C por 30 min.
  4. Una vez digerido el plásmido, se agregó 1  $\mu\text{L}$  de amortiguador de carga para electroforesis.
  5. Se corrió la electroforesis en gel de agarosa al 1% con amortiguador TAE para el plásmido completo, plásmido digerido y marcador de peso molecular (2log DNA Ladder BisLabs).
  6. Se tiñó el gel con bromuro de etidio y se observó en el trans-iluminador UV.
- 
- 

#### 8.8.4 EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA RE-COMBINANTE ( $\alpha$ -GI-L6H).

El plásmido que lleva a la proteína  $\alpha$ -GI-L6H es derivado del pET22b(+) y en consecuencia tiene un promotor de T7 que además contiene un operador *lac*. Esta característica permite utilizar un inductor no natural como el IPTG, que al unirse al represor LacI lo despega del operador *lac*; esto permite que la RNAPol de T7, cuya expresión también está regulada por el operador *lac*, se una al promotor T7 y transcriba el gen que codifica para la proteína recombinante.

---

---

**Protocolo**

---

---

1. Se inoculó una asada de colonias transformadas en 10 mL de agar LB + amp.
  2. Se incubó a 37 °C por 16 h.
  3. Se trasvasó el tubo de 10 mL a un matraz Erlen-Meyer bafleado, con 200 mL de agar LB + amp.
  4. Se incubó a 37 °C durante 4 h.
  5. Se trasvasó el medio a un matraz Erlen-Meyer bafleado, con 500 mL de medio LB + amp.
  6. Se incubó durante 2 h a 37 °C.
  7. Por último se agregó IPTG (0.25 mM concentración final).
  8. Se dejó incubar a 37 °C a 150 rpm por 16 h.
  9. Para corroborar la sobre-expresión proteica, se corrió un gel de poliacrilamida al 12% en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE).
- 
- 

#### 8.8.5 PURIFICACIÓN DE $\alpha$ -GI-L6H

La  $\alpha$ -GI-L6H está provista de una etiqueta de seis residuos de histidina, esta característica permite su purificación mediante cromatografía de afinidad. Las columnas empleadas para dicho proceso fueron empacadas con una resina que en su matriz posee iones de níquel, metal que presenta afinidad por los residuos de histidina presentes en la proteína.

---

---

**Protocolo para obtener la proteína**

---

---

1. El cultivo obtenido del punto 8 del protocolo 6.8.4 se centrifugó a 5000 rpm por 15 min a 4 °C.
  2. Se desechó el sobrenadante y se resuspendió el botón celular en 15 mL de amortiguador de lisis pH 6.3.
  3. Se sónico, en baño de hielo, 30 min con pulsos de 20 s intercalados con 30 s de descanso (hasta distinguir claramente dos fases).
  4. Se centrifugó a 8000 rpm por 15 min a 4 °C.
  5. Se colocó el sobrenadante en baño de hielo.
- 
-

---

---

**Protocolo purificación en columna de afinidad**

---

---

1. Se montó la columna con 10 g de resina Ni-TED.
2. Se lavó la columna con 100 mL de agua destilada.
3. Se equilibró la columna con 30 mL de amortiguador de elución con 5 mM de imidazol.
4. Se colocaron 5 mL del extracto celular (se purificó en ciclos de 5 mL).
5. Se corrieron 100 mL de amortiguador de elución con 5 mM de imidazol. Se colectaron los primeros 50 mL en una probeta y los 50 mL finales como otra fracción.
6. Se corrieron 50 mL de amortiguador de elución con 75 mM de imidazol. De igual manera los primeros 25 mL se recolectaron como una fracción y los últimos 25 mL como otra diferente.
7. Se corrieron para despegar otras proteínas de la columna 30 mL de amortiguador de elución con 275 mM de imidazol.
8. Para lavar la columna se corrieron 100 mL de agua destilada.
9. De cada fracción se tomaron 200  $\mu$ L y se dializaron contra amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7 por 16 h.
10. Se corrió gel de poliacrilamida al 12% en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) para apreciar el grado de purificación de las fracciones obtenidas.
11. Se juntaron las fracciones con purezas similares (fracciones 2-3 y fracciones 1-4).
12. Las fracciones se pasaron por centricones con corte de 50 kDa. Con cambio de amortiguador de columna a amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.
13. Se guardó la proteína a  $-4^{\circ}\text{C}$ .

Nota 1: Todos los amortiguadores deben estar fríos al momento de correrse en la columna.

Nota 2: Cada amortiguador se adiciona cuando quedan aproximadamente 2 mL del amortiguador anterior sobre la resina.

Nota 3: Al terminar cada ciclo, si no se usara la columna se debe mantener la resina hidratada en etanol al 20%.

---

---

#### 8.8.6 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN PROTEÍCA DE $\alpha$ -GI-L6H

La concentración de la  $\alpha$ -GI-L6H se determinó por el método del ácido-bicinconínico (BCA), método colorimétrico que usa como referencia una curva-patrón de albúmina sérica bovina (BSA).

---



---

### Protocolo

---



---

1. La curva patrón y las muestras se prepararon al mismo tiempo y bajo las mismas condiciones. Todas las mediciones se realizaron por triplicado (Cuadro 8.2). Todo se preparó en tubos de ensayo de 6 mL.
  2. Cada tubo se agitó en el vortex y se incubó a 37 °C durante 30 min.
  3. Después del periodo de incubación todos los tubos se colocaron en baño de hielo para detener el progreso de la reacción.
  4. Se determinó la absorbancia de las muestras y los puntos de la curva patrón a 562 nm en el espectrofotómetro Libra Biochrome.
  5. Con los valores obtenidos se construyó la curva patrón y por interpolación se determinó la concentración de las muestras.
  6. Finalmente para guardar la enzima y proseguir con otros experimentos, al volumen total de cada purificación se añadió un mismo volumen de glicerol y se resguardaron a -4°C.
- 
- 

**Cuadro. 8.2** Diseño experimental para la determinación de la concentración proteica por el método del BCA.

<b>Muestra</b>	<b>Volumen en <math>\mu</math>L de albúmina (1 mg/mL)</b>	<b>Volumen en <math>\mu</math>L de <math>\alpha</math>-GI-L6H concentrada</b>	<b>Volumen de agua (<math>\mu</math>L)</b>	<b>BCA (9.8 mL): CuSO<sub>4</sub> 4% (0.2 mL) (mL)</b>
Blanco	0	-	50	1000
BSA	4	-	46	1000
BSA	8	-	42	1000
BSA	16	-	34	1000
BSA	32	-	18	1000
BSA	40	-	10	1000
Proteína Pura	-	20	30	1000
Proteína Pura	-	30	20	1000
Proteína Pura	-	40	10	1000
Proteína Impura	-	20	30	1000
Proteína Impura	-	30	20	1000
Proteína Impura	-	40	10	1000

---



---

### 8.8.7 DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE $\alpha$ -GI-L6H

Sabiendo que la Ima1p de *S. cerevisiae* tiene una alta actividad catalítica para enlaces  $\alpha$ -1,6-glucosídicos y que Deng y su equipo reportan que presenta actividad residual para enlaces  $\alpha$ -1,4-glucosídicos en triosas, se incubó la  $\alpha$ -GI-L6H con glucógeno y almidón para determinar si tiene actividad enzimática para estos sustratos.

Aprovechando que los sacáridos pueden eluir en un soporte sólido con relativa facilidad, se determinó que una cromatografía en capa fina, revelada con timol:H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> podría resultar un buen método para identificar si la glucosidasa purificada presenta actividad catalítica para los sustratos mencionados.

---

---

#### Protocolo

---

---

1. Se realizaron soluciones patrón para almidón soluble (1% p/V micro-filtrado), glucógeno (8 mg/mL en amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7) y glucosa (1%).
  2. Se tomó 1 mL de la enzima pura en glicerol y se dializó frente a amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7 para retirar el glicerol que genera interferencia en la cromatografía en capa fina.
  3. Una vez dializada se montaron las reacciones enzimáticas colocando volúmenes iguales de sustrato como de proteína y CaCl<sub>2</sub> 0.1 mM.
  4. Las reacciones se dejaron incubar a 37 °C con agitación orbital de 400 rpm por 24 h.
  5. Utilizando placas cromatográficas de gel de sílice se corrieron las muestras para los controles: glucosa, almidón, glucógeno y para las reacciones enzimáticas. Utilizando para cada punto 5  $\mu$ L de solución.
  6. Las placas cromatográficas se eluyeron en cámaras especiales usando como fase móvil EtOH:Butanol:H<sub>2</sub>O (30:50:20). Cada placa se eluyó dos veces en la misma fase.
  7. Las placas se dejaron secar y se revelaron dispersando una solución de timol:H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> con posterior calentamiento a 150°C.
- 
-

### 8.8.8 PRUEBAS DE DESNATURALIZACIÓN ENZIMÁTICA/ RE-PLGAMIENTO ENZIMÁTICO

La estructura tridimensional de una proteína en condiciones fisiológicas se conoce como estructura nativa y se considera una de las estructuras más estables de entre todas las posibles ( $G^\circ$  menor), además es la estructura funcionalmente activa. Sí cambiamos radicalmente las condiciones ambientales en que se encuentra embebida, la estructura nativa se pierde, a este proceso se le denomina desnaturalización. Podemos conseguir la desnaturalización de una proteína mediante: aumento de la temperatura, cambios drásticos de pH, añadiendo agentes caotrópicos, como urea y cloruro de guanidinio (GndHCl), o mediante disolventes orgánicos como el etanol.

El proceso de plegamiento, como cualquier otro proceso biológico, se encuentra bajo control termodinámico y cinético. Es un proceso que está claramente favorecido en condiciones fisiológicas ( $\Delta G$  negativo).

Dado que Santillán y colaboradores, en 2015, reportan que las condiciones óptimas de ensamble de las VLPs del B19V requieren ser desnaturalizantes, es importante, para el propósito de este trabajo que la  $\alpha$ -GI-L6H recupere su conformación nativa después de desnaturalizarla.

---

---

#### **8.8.8.1 Protocolo: seguimiento del re-plegamiento enzimático por cromatografía en capa fina**

---

---

1. Se colocaron dos Eppendorf con 150  $\mu$ L de proteína dializada en amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.
  2. Se llevó a 1 mL cada Eppendorf con amortiguador de fosfatos 5 mM pH 7 adicionado con el respectivo desnaturalizante (urea 6 M o GndHCl 3 M).
  3. Se incubaron a 25 °C con agitación orbital a 400 rpm en el Thermomixer
- 
-

---

---

durante 72 h.

4. Las muestras se pasaron a tubos Eppendorf con una perforación en la tapa para diálisis. Se dializó cada muestra contra 50 mL de amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7 durante 48 h a 6°C. Se realizaron recambios cada 24 h.
  5. Se montaron reacciones enzimáticas para almidón y para glucógeno con las dos enzimas (desnaturalizadas por urea y por GndHCl). Las reacciones enzimáticas se dejaron a 37 °C con agitación orbital a 400 rpm en el Thermomixer por 24 h.
  6. Se realizaron análisis por cromatografía en capa fina para cada reacción enzimática. Condiciones del método 6.8.7.
- 
- 

Además de la cromatografía en capa fina, que únicamente, nos proporciona un resultado cualitativo de la degradación del almidón o glucógeno, se realizaron pruebas en HPLC de las reacciones enzimáticas para ambos sustratos con la enzima nativa y con la enzima re-plegada, con las que se podrá identificar el grado de hidrólisis que la enzima alcanza.

---

---

#### **8.8.8.2 Protocolo HPLC**

---

---

1. Se filtraron las muestras por membranas de 0.22 µm.
  2. Se inyectaron 20 µL de cada muestra a un equipo de HPLC HP 1100 equipado con una columna Aminex HPX-42A 300 x 7.8 mm. Se utilizó agua desionizada filtrada a 80 °C como fase móvil, a un flujo de 0.6 mL/min. Se usó un detector de índice de refracción.
- 
- 

En bioquímica, la fluorescencia se utiliza cotidianamente para seguir los cambios estructurales que modifican la fluorescencia intrínseca de las proteínas, generada por tres aminoácidos aromáticos: fenilalanina, tirosina y triptófano. En especial, la

emisión máxima y el rendimiento cuántico del triptófano varían enormemente entre proteínas, es decir, cada proteína genera un espectro de fluorescencia único. Cuando una proteína se desnaturaliza el espectro de emisión así como el rendimiento cuántico de los triptófanos son proporcionales al des-plegamiento de la proteína. Por lo tanto, las variaciones en la emisión de los triptófanos son debidas a las modificaciones estructurales de la proteína<sup>37</sup>.

---

**8.8.8.3 Protocolo desnaturalización de  $\alpha$ -GI-L6H seguido por fluorescencia.**

---

1. Se realizó un patrón de proteína (0.05 mg/mL) en amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.
  2. En tubos Eppendorf se colocó a desnaturalizar la proteína del patrón a diferentes concentraciones de GndHCl (0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 3 y 6 M) además de un control con la misma concentración de proteína sin GndHCl.
  3. Todas las pruebas de desnaturalización se colocaron a 20 °C por 24 h. El control se colocó a 6 °C para conservar la proteína en estado nativo.
  4. Pasada la incubación, en el fluorómetro ISS se colocaron las condiciones de lectura después de dejar calentar la lámpara por 45 min y siguiendo las instrucciones de uso:
    - Slit<sub>excitación</sub>: 0.5 en 200 nm
    - Slit<sub>emisión</sub>: 0.25 en 200 nm
      - $\lambda_{excitación}$ : 290 nm
      - Temperatura: 20 °C
    - Espectro desde 300 y hasta 400 nm en lecturas a cada nm.
  5. Se tomó el espectro con el amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7 para poder restarlo a los demás espectros de emisión.
  6. Se leyó el espectro para el control de proteína y posteriormente el de las desnaturalizaciones en orden creciente de concentración de GndHCl.
  7. Después de leer todas las muestras, la reacción con 6 M de GndHCl se colocaron a dializar en tubos Eppendorf con amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7 a 20°C durante 3 días con cambio de amortiguador cada 24 h.
  8. Se volvió a leer estas muestras en las mismas condiciones de ensayo en el ISS.
-

A pesar de que la estructura primaria de las proteínas contienen la información necesaria para el correcto plegamiento de la misma, muchas proteínas necesitan la presencia de otras moléculas para lograr su conformación nativa, y por tanto, su conformación funcionalmente activa. Teniendo esto en mente y sabiendo que la enzima si presenta actividad enzimática para sustratos como almidón y glucógeno, se propuso utilizar estos sustratos como coadyuvantes en el correcto re-plegamiento de la quimera.

---

---

#### **8.8.8.4 Protocolo Influencia de sustratos en el plegamiento enzimático.**

---

---

1. Se colocaron reacciones de desnaturalización con 3 M y 6 M de GndHCl y concentración final de proteína de 0.05 mg/mL a 20 °C por 24 h. Por duplicado.
  2. Un par de muestras se colocaron en membrana de diálisis contra amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7 (400 mL para 3 M GndHCl y 500 mL para 6 M de GndHCl) durante 4 h. A las muestras se les adicionó glucógeno (0.18 mg/mL).
  3. El par restante se colocó en membranas de diálisis contra amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7 (400 mL para 3 M GndHCl y 500 mL para 6 M de GndHCl) durante 4 h. Adicionando a las muestras almidón soluble 0.5 % p/v total.
  4. A todas las muestras se les midió el índice de refracción, así como al amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7 y al amortiguador con GndHCl para hacer el cálculo de GndHCl contenido aún en las muestras.
  5. Una vez que la concentración de GndHCl es casi nula, es decir, que no afecta significativamente el centro de masa espectral (SCM) de la enzima (obtenido por fluorescencia), cada muestra se utilizó para montar reacciones enzimáticas con almidón y con glucógeno.
  6. A las muestras enzimáticas con almidón y glucógeno después de 24 h se analizaron por cromatografía en capa fina y se les añadió pNPG 5 mM para evaluar la actividad para sustratos pequeños.
  7. Se analizaron cualitativamente estos resultados.
- 
-

### 8.8.9 DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS CINÉTICOS DE $\alpha$ -GI-L6H A PARTIR DE LAS VELOCIDADES INICIALES ( $V_0$ ) DE REACCIÓN PARA LA HIDRÓLISIS DEL 4-NITROFENIL- $\alpha$ -GLUCOPIRANOSIDO (pNPG)

Para obtener los valores cinéticos de la  $\alpha$ -GI-L6H se determinaron espectrofotométricamente las velocidades iniciales ( $V_0$ ) de la enzima frente a diferentes concentraciones de un sustrato cromogénico (pNPG) que Deng y colaboradores reportan con buena actividad específica (Cuadro. 8.3)<sup>8</sup>.

---

---

#### Protocolo

---

---

1. Se trabajó a una concentración de 0.40 nM de enzima, partiendo de un patrón a 20.53 nM de proteína en amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.
  2. Se preparó además un patrón de pNPG 15 mM en amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.
  3. Para cada curva de  $v_0$  se usó una concentración diferente de sustrato (0.39, 0.49, 0.59, 0.69, 0.79, 1.0, 1.5, 2.5, 3.5, 5.0, 7.0 y 10 mM).
  4. Antes de usar tanto el patrón de enzima como el amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7 se incubaron a 25 °C por 25 min.
  5. Se blanqueó con el amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.
  6. La reacción se inició mediante la adición de la enzima. Las celdas de reacción se leyeron en el espectrofotómetro CARY a 30 °C y 405 nm por un periodo de 5 min.
  7. Adicionalmente se realizó una curva-patrón con 4-nitrofenol para el tratamiento de los datos.
  8. Se realizó el tratamiento estadístico de los datos de  $V_0$  y la curva patrón.
- 
-

**Cuadro. 8.3** Diseño experimental para determinar  $V_0$  de la  $\alpha$ -GI-L6H usando pNPG.

Muestra	[pNPG] mM	Volumen de pNPG (Patrón 15 mM) $\mu$ L	Volumen de Proteína (Patrón 20.53 nM) $\mu$ L	Volumen de amortiguador de fosfatos (50 mM pH 7.0) $\mu$ L
1	0.39	26	19.39	974.61
2	0.49	33	19.39	947.61
3	0.59	39	19.39	941.61
4	0.69	46	19.39	934.61
5	0.79	53	19.39	927.61
6	1.0	67	19.39	913.61
7	1.5	100	19.39	880.61
8	2.5	166.6	19.39	814.01
9	3.5	233.3	19.39	747.31
10	5	333.3	19.39	647.31
11	7	466.6	19.39	514.01
12	10	666.6	19.39	314.01

#### 8.8.10 ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN CONDICIONES EX-VIVO (25°C, pH 7) Y CONDICIONES LISOSOMALES (37°C, pH 5).

Ya que la  $\alpha$ -GI-L6H se pretende usar como un potencial fármaco para enfermedades de almacenamiento lisosomal (Enfermedad de Cori-Forbes y Enfermedad de Pompe), es necesario conocer la estabilidad enzimática en estas condiciones. Para esto se determinaron las  $V_0$  de la enzima contra pNPG (5 mM) a diferentes intervalos de incubación (Cuadro. 8.4).

---

---

**8.8.10.1 Protocolo: 25 °C y pH 7**

---

---

1. Se preparó un patrón de proteína (20.53 nM ) en amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7 que se atemperó a 25 °C por 10 min antes del ensayo.
  2. El pNPG se preparó con amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7. De tal manera que la concentración final de pNPG en el ensayo fuese de 5 mM.
  3. En el espectrofotómetro CARY se blanqueó con amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7 a 405 nm y 25 °C.
  4. En cada celda de reacción se colocó el amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7 y la cantidad de enzima necesaria para que la concentración final fuese de 0.40 nM y se pre-incubó 5 min a 25 °C en el equipo.
  5. Una vez incubada la celda se adicionó el sustrato. Homogenizando e iniciando inmediatamente la lectura a 405 nm por 5 min.
  6. Tomada la primera lectura (tiempo 0) el patrón de la enzima se incubó a 25 °C en el Thermomixer.
  7. Se tomaron muestras con las mismas condiciones a los tiempos: 10, 20, 50, 90, 120, 150, 210 y 270 min.
- 
- 

---

---

**8.8.10.2 Protocolo 37 °C y pH 5**

---

---

1. Se preparó un patrón de proteína (20.53 nM) en amortiguador de acetatos 50 mM pH 5 que se atemperó a 37 °C por 10 min antes del ensayo.
  2. El pNPG se preparó con amortiguador de acetatos 50 mM pH 5. La concentración final del pNPG en el ensayo fue de 5 mM.
  3. En el espectrofotómetro CARY se blanqueó con amortiguador de acetatos 50 mM pH 5 a 405 nm y 37 °C.
  4. En cada celda de reacción se colocó el amortiguador de acetatos 50 mM pH 5 y la cantidad de enzima necesaria para que la concentración final fuese de 0.40 nM y se pre-incubó 5 min a 37 °C en el equipo.
  5. Una vez incubada cada celda se adicionó el sustrato homogenizando e iniciando inmediatamente la lectura a 405 nm por 5 min.
  6. Tomada la primera lectura (tiempo 0) el patrón de la enzima se incubó a 37 °C en el Thermomixer.
  7. Se tomaron muestras en las mismas condiciones a los tiempos: 10, 20, 50, 90, 120, 150, 210 y 270 min.
- 
-

**Cuadro. 8.4** Diseño experimental para los análisis de estabilidad en condiciones ex-vivo y lisosomales. Teniendo en cuenta el uso de diferentes amortiguadores para cada prueba.

<b>Tiempo incubación (min)</b>	<b>Vol. <math>\alpha</math>-Gl-L6H (20.53 nM) en <math>\mu</math>L</b>	<b>Vol. Amortiguador (<math>\mu</math>L)</b>	<b>Vol. pNPG (15 mM) en <math>\mu</math>L</b>
<b>0</b>	19.4	647.3	333.3
<b>10</b>	19.4	647.3	333.3
<b>20</b>	19.4	647.3	333.3
<b>50</b>	19.4	647.3	333.3
<b>90</b>	19.4	647.3	333.3
<b>120</b>	19.4	647.3	333.3
<b>150</b>	19.4	647.3	333.3
<b>210</b>	19.4	647.3	333.3
<b>270</b>	19.4	647.3	333.3

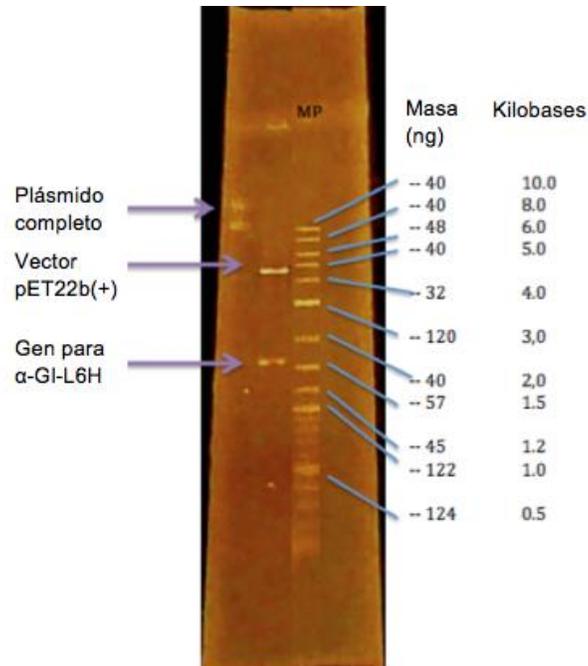
## 9. RESULTADOS Y ANÁLISIS

### 9.1 TRANSFORMACIÓN DE *E. coli* CEPA BL21(DE3)

La transformación correcta de las células de *E. coli* BL21(DE3) implica que la bacteria logre incorporar el plásmido adquiriendo la resistencia a la ampicilina contenida en él. Esto nos garantizó, al inocular las células en agar LB + amp, que únicamente crecieran bacterias que tuvieran el plásmido incorporado. De estas bacterias se escogieron las que estuvieran aisladas para realizar la purificación del plásmido.

### 9.2 PURIFICACIÓN DEL PLÁSMIDO

El plásmido fue extraído y purificado mediante el método fenol-cloroformo descrito en la metodología. A una parte del plásmido purificado se le realizó una digestión con las enzimas de restricción *Xho*I y *Nde*I para verificar la identidad del mismo. Se corrió gel de agarosa al 1% para ambas fracciones (completa y digerida) en el que se observó una sola banda de aproximadamente 7 kpb para el carril con el plásmido completo y dos bandas, una de 5.5 kpb y otra de 1.7 kpb, que corresponden al vector pET22b(+) y al gen de la  $\alpha$ -GI-L6H en el carril del plásmido digerido (Fig. 9.1).

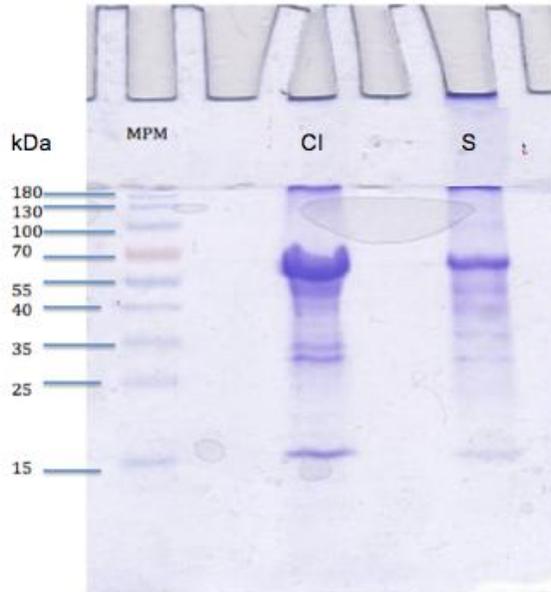


**Fig. 9.1 Purificación del plásmido incorporado a *E. coli*.** Gel de agarosa al 1%. En el primer carril se observa el plásmido completo con un valor aproximado de 7 kpb. En el segundo carril se observan dos bandas una de aproximadamente 5.5 kpb característico del vector pET22b(+) y otra de aproximadamente 1.7 kpb, valor esperado para el gen de la  $\alpha$ -GI-L6H. En el último carril está el marcador de peso molecular 2log DNA Ladder BisLabs.

### 9.3 EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE $\alpha$ -GI-L6H

Cuando se conjugan una cepa de *E. coli* como la BL21(DE3) y un plásmido de la familia pET se tiene un alto control sobre la expresión de la proteína de interés, debido a que, solamente es producida cuando se añade al medio de cultivo el inductor artificial IPTG, capaz de unirse al represor LacI y desplazarlo del promotor T7 para ser transcrito por la RNA polimerasa de T7. Siguiendo esta lógica, se comprobó la sobreexpresión de la  $\alpha$ -GI-L6H, posteriormente se corrió un gel de

poliacrilamida (SDS-PAGE) para identificar si la proteína se encontraba en cuerpos de inclusión o en el sobrenadante de la lisis celular (Fig. 9.2).



**Fig. 9.2 Expresión de la  $\alpha$ -GI-L6H.** SDS-PAGE sobreexpresión de  $\alpha$ -GI-L6H. Primer carril marcador de peso molecular (Prestainer Protein Ladder). Segundo carril (CI) cuerpos de inclusión de la lisis celular. Tercer carril (S) sobrenadante de la lisis celular. En ambas fracciones se observa la presencia de una sobreexpresión proteica alrededor de 69 kDa.

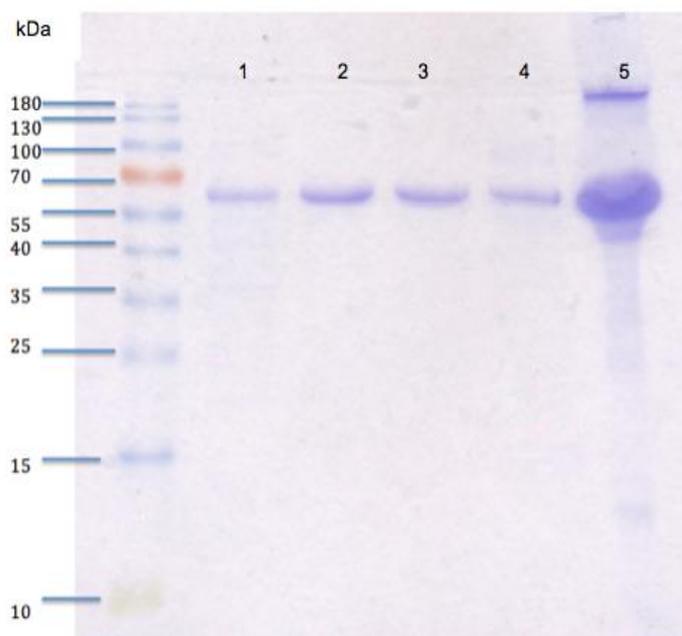
Comparando los valores teóricos con los obtenidos experimentalmente, se confirmó que el plásmido se insertó correctamente y además que la inducción proteica fue exitosa (Cuadro 9.1). Aunque se observó que la mayor parte de la proteína se encuentra en los cuerpos de inclusión, se puede obtener una buena fracción del sobrenadante de lisis celular. Por lo que se continuó con la purificación en condiciones no desnaturalizantes de la fracción soluble obtenida.

**Cuadro 9.1** Comparación de los valores teóricos y experimentales del peso molecular del gen *IMA1p* y del peso molecular de la  $\alpha$ -GI-L6H.

	<b>Kpb (gen <math>\alpha</math>-GI-L6H)</b>	<b>kDa Cuerpos de inclusión</b>	<b>kDa Sobrenadante</b>
<b>Valor teórico</b>	1.767 kpb	70 kDa	70kDa
<b>Valor obtenido</b>	Entre 1.5 y 2.0 kpb	Aprox. 69 kDa	Aprox. 69 kDa

Una vez comprobada la sobre-expresión enzimática se prosiguió con el escalamiento a 500 mL de cultivo, de donde se purificó la enzima por cromatografía de afinidad en columna de níquel (Ni-TED) en condiciones no desnaturizantes, corroborando la purificación con SDS-PAGE (Fig. 9.3). Se observó que en las fracciones intermedias se obtuvo la enzima con una buena pureza, mientras que en las fracciones 1, 4 y 5 hay aún bastante proteína pero contaminada, probablemente por la presencia de otras proteínas intracelulares con residuos de histidina que interactúan con la resina.

Teniendo esto en cuenta, las fracciones 2 y 3, que presentan una pureza bastante alta se concentraron juntas. Y debido a que las fracciones 1 y 4 tienen una pureza similar se procedió a concentrarlas. El proceso de concentración se llevó a cabo en centricones con corte de 50 kDa. Durante la concentración de las fracciones 1-4 y 2-3 se cambió el amortiguador con imidazol por amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7. La fracción 5 aunque contiene la proteína de interés está muy contaminada por lo que se descartó trabajar con ella.



**Fig. 9.3 Purificación de la  $\alpha$ -GI-L6H.** SDS-PAGE purificación por cromatografía de afinidad con níquel. El primer carril corresponde al marcador de peso molecular. La fracción 1 representa los primeros 50 mL con amortiguador con 5 mM de imidazol. La fracción 2 representa a los últimos 50 mL del amortiguador con 5 mM de imidazol. La fracciones 3 y 4 representan los primeros y últimos 25 mL del amortiguador con 75 mM de imidazol. La fracción 5 representa la elución del amortiguador con 275 mM de imidazol.

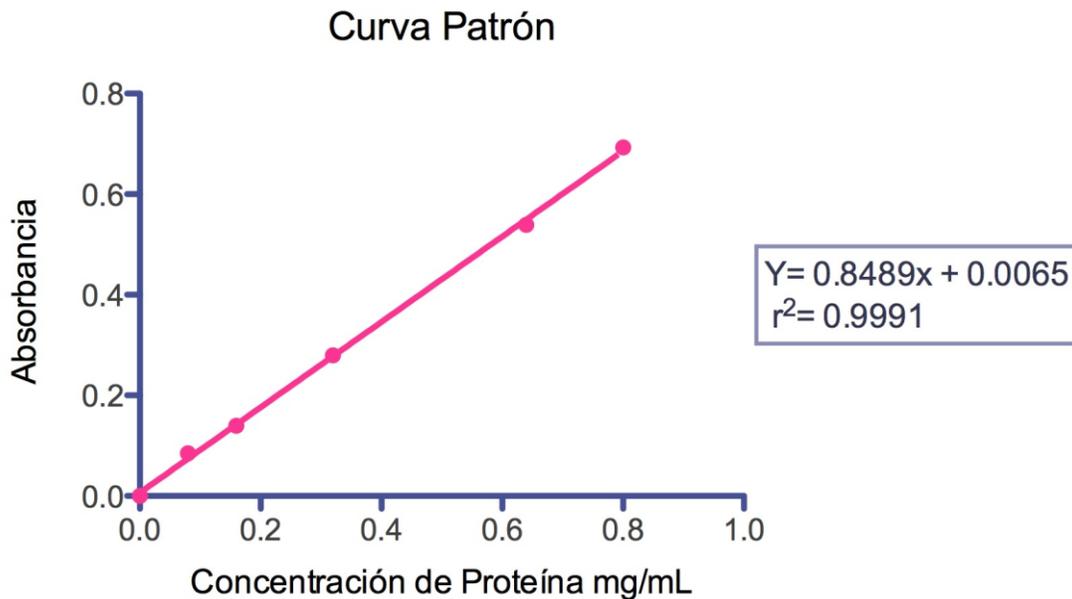
Los valores fisicoquímicos de la  $\alpha$ -GI-L6H se calcularon usando el servidor PROTPARAM disponible en: <http://web.expasy.org/protparam/> (Cuadro 9.2).

**Cuadro. 9.2** Propiedades fisicoquímicas para la  $\alpha$ -GI-L6H usando PROTPARAM.

Propiedades físico-químicas de la quimera $\alpha$ -GI-L6H (PROTPARAM)	Valor
Peso molecular	70132,0 g/mol
Coefficiente de extinción	151970 M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>
Número de a. a.	606
Punto isoeléctrico	5.52

#### 9.4 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN PROTEÍCA (MÉTODO BCA)

La concentración de la  $\alpha$ -GI-L6H se realizó mediante el método del ácido-bicinconínico (BCA), preparando una curva patrón (Fig. 9.4) con albúmina sérica bovina (BSA) para posteriormente interpolar las absorbancias obtenidas de las muestras de la proteína en cuestión (Cuadro 9.3).



**Fig. 9.4** Curva patrón de BSA mediante el método del BCA. Lectura a 562 nm.

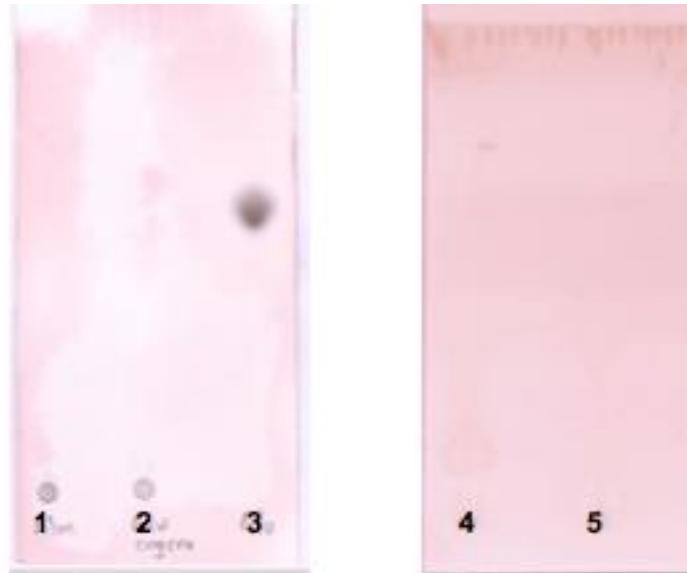
Se obtuvieron 25 mL de ambas proteínas en solución concentrada teniendo un rendimiento por cada 500 mL de medio de cultivo de 3.61 mg de proteína altamente pura y 13.35 mg de proteína parcialmente pura.

**Cuadro. 9.3** Determinación de la concentración de la  $\alpha$ -GI-L6H por interpolación con la curva patrón de BSA mediante el método del BCA. Determinación a 562 nm.

Muestra	Absorbancia	Interpolación (mg/mL)	Concentración real (mg/mL)
Proteína pura (20 $\mu$ L)	0.058	0.0606	0.1515
Proteína pura (30 $\mu$ L)	0.076	0.0818	0.1363
Proteína pura (40 $\mu$ L)	0.105	0.1160	0.1450
Proteína impura (20 $\mu$ L)	0.163	0.1843	0.4608
Proteína impura (30 $\mu$ L)	0.319	0.3681	0.6135
Proteína impura (40 $\mu$ L)	0.365	0.4223	0.5279
<b>Concentración promedio proteína pura</b>		0.1443 mg/mL	
<b>Concentración promedio proteína impura</b>		0.5341 mg/mL	

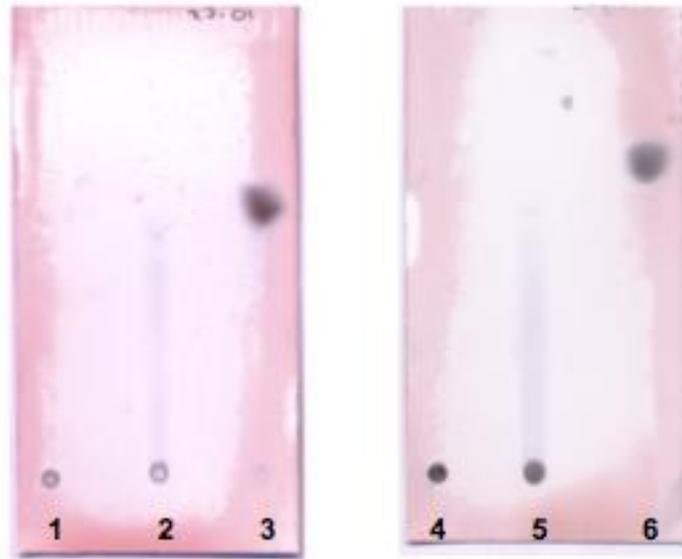
## 9.5 DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE $\alpha$ -GI-L6H

Para la determinación cualitativa de la actividad enzimática de la glucosidasa se realizaron cromatografías en placa fina para seguir el avance de las reacciones enzimáticas con almidón y glucógeno (Fig. 9.6). Adicionalmente, se realizó cromatografía en capa fina para los controles de los sustratos, los posibles productos y la enzima sin sustrato, para corroborar que existe actividad catalítica (Fig. 9.5).



**Fig. 9.5 Cromatografía en capa fina para controles.** 1 (Almidón), 2 (Glucógeno), 3 (Glucosa), 4 (Enzima nativa) y 5 (Amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7). Ambas placas eluidas dos veces con fase EtOH:H<sub>2</sub>O:ButOH (30:20:50) y reveladas con solución H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – Timol calentando a 150° C.

En las cromatografías en capa fina de la figura 9.5 se puede observar que el almidón, el glucógeno, la enzima y el amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7 no presentan manchas moradas que pudiesen representar falsos positivos en estas pruebas. En el caso del carril número 3 en donde se colocó la glucosa, se observa la mancha característica para este monosacárido por lo que se utilizó como patrón de elución. Lo que garantizó que las manchas observadas en las cromatografías en capa fina de la figura 7.6 son correspondientes a las reacciones enzimáticas contra almidón y glucógeno.

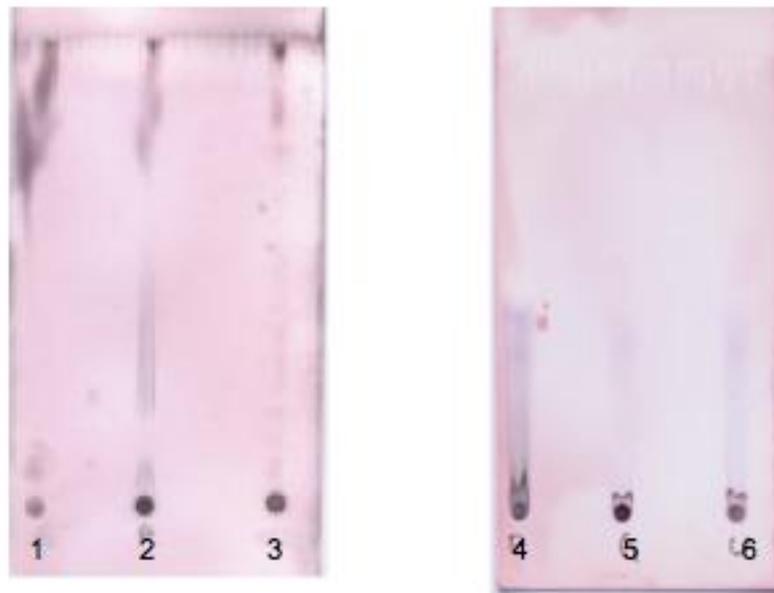


**Fig. 9.6 Cromatografías en capa fina para las reacciones con almidón y glucógeno a 24 horas de incubación.** El orden de las muestras es el siguiente: 1 (Almidón), 2 (Reacción enzimática: enzima nativa + almidón), 3 (Glucosa), 4 (Glucógeno), 5 (Reacción enzimática: enzima nativa + glucógeno), 6 (Glucosa). Ambas placas eluidas dos veces en fase EtOH:H<sub>2</sub>O:ButOH (30:20:50) y reveladas con solución H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – Timol y calentando a 150° C.

## 9.6 PRUEBAS DE RE-PLEGAMIENTO

### 9.6.1 RE-PLEGAMIENTO ENZIMÁTICO SEGUIDO POR CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA

Debido a que uno de los objetivos es estudiar si la  $\alpha$ -1,6-glucosidasa de *S. cerevisiae* logra re-plegarse *in vitro* correctamente (conservando actividad enzimática) para poder lograr su presentación en la superficie de VLPs del B19V, se desnaturalizó la enzima con urea y GndHCl, re-plegando y realizando reacciones de actividad enzimática para almidón y glucógeno analizadas mediante cromatografía en capa fina (Fig. 9.7)



**Fig. 9.7 Cromatografía en capa fina para reacciones enzimáticas de 24 horas con almidón y glucógeno con enzima re-plegada.** Después de desnaturalizar con urea 6 M y GndHCl 3 M por 72 horas y re-plegando en amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7 se analizaron las reacciones mediante cromatografía en capa fina eluyendo dos veces con fase EtOH:H<sub>2</sub>O:ButOH (30:20:50) y revelando con solución H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – Timol calentando a 150° C. El orden de las muestras es el siguiente: (1) Enzima desnaturalizada con 3 M GndHCl/re-plegada + almidón; (2) Enzima nativa + almidón; (3) Enzima desnaturalizada con 6 M Urea/re-plegada + almidón; (4) Enzima nativa + glucógeno; (5) Enzima desnaturalizada con 3 M GndHCl/re-plegada + glucógeno; (7) Enzima desnaturalizada con 6 M Urea/re-plegada + glucógeno.

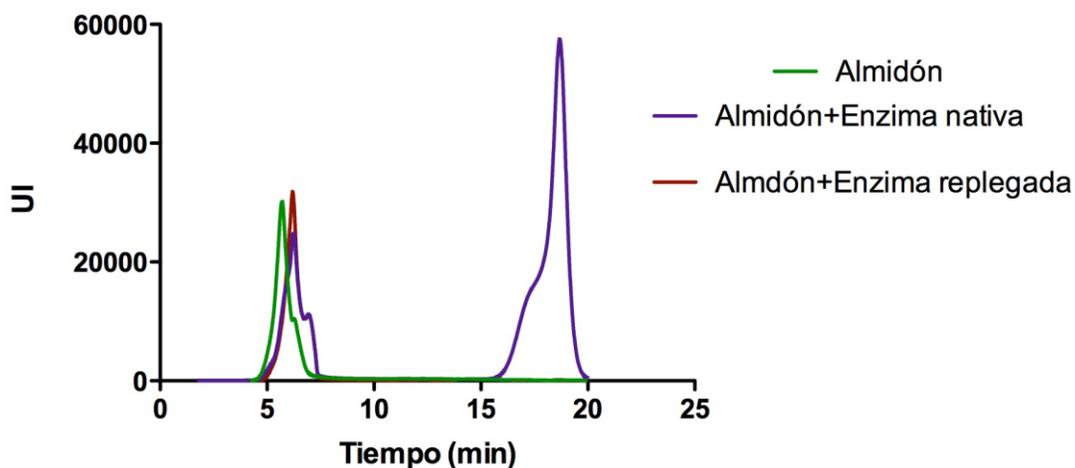
Estas pruebas muestran que la enzima desnaturalizada con 3 M de GndHCl (puntos 1 y 5) no logra re-plegarse correctamente, o en tal caso, solo se logra re-plegar una fracción mínima de enzima, debido a que, no se observan manchas significativas y comparables con las generadas en las reacciones con enzima nativa para cada sustrato respectivamente: almidón (punto 2) y glucógeno (punto 4). En el caso de las muestras desnaturalizadas con 6 M de urea, los resultados

sugieren que la enzima logra un mejor re-plegamiento aunque no al 100% ya que no se obtienen manchas nítidas como las presentadas por la enzima nativa.

### 9.6.2 REPLEGAMIENTO ENZIMÁTICO SEGUIDO POR HPLC

Una medida para comprobar la hidrólisis de los sustratos utilizados fue analizar el cambio de peso molecular y la aparición de azúcares más pequeños por HPLC en las reacciones enzimáticas realizadas con la enzima en estado nativo y re-plegado para almidón (Fig. 9.8) y glucógeno (Fig. 9.9).

#### Reacciones con almidón como sustrato

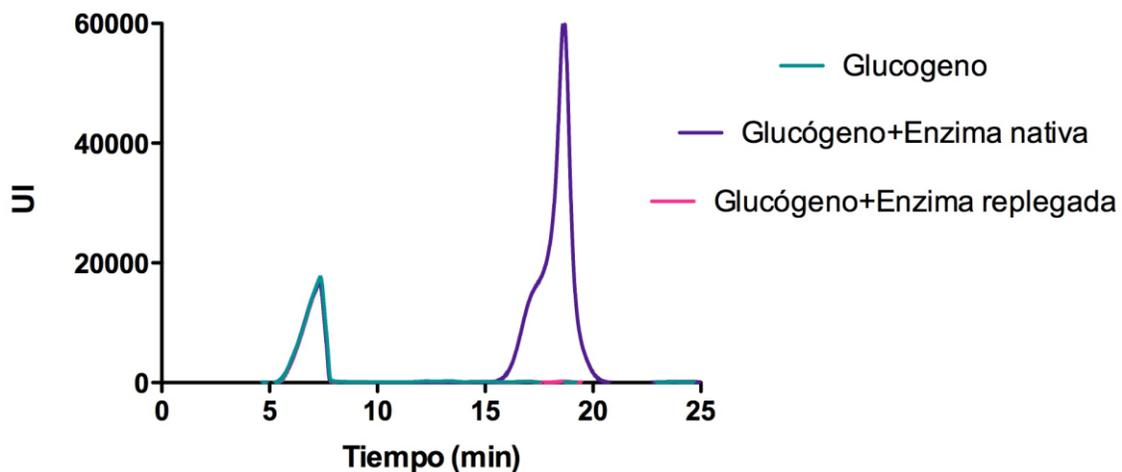


**Fig. 9.8 Superposición de los cromatogramas obtenidos a partir de las reacciones enzimáticas con almidón como sustrato.** Verde: Pico representativo del almidón. Morado: Pico del producto de la reacción entre el almidón y la enzima en estado nativo. Café: Pico generado de la reacción entre el almidón y la enzima re-plegada, después de ser desnaturalizada con GndHCl 3 M.

Este resultado proporcionó información importante que permitió dilucidar la actividad catalítica de la quimera en ambas situaciones. Como se puede observar

en las Fig. 9.8 y Fig. 9.9, la enzima en estado nativo genera picos de azúcares más pequeños, tanto para la hidrólisis de almidón como para glucógeno respectivamente, sin embargo, una vez que se desnaturaliza y luego se re-plega la enzima ésta pierde casi completamente su actividad enzimática para ambos sustratos. Se puede suponer que, como se observó en el experimento de fluorescencia, solo una fracción muy pequeña de la enzima se repliega correctamente.

### Reacciones con glucógeno como sustrato

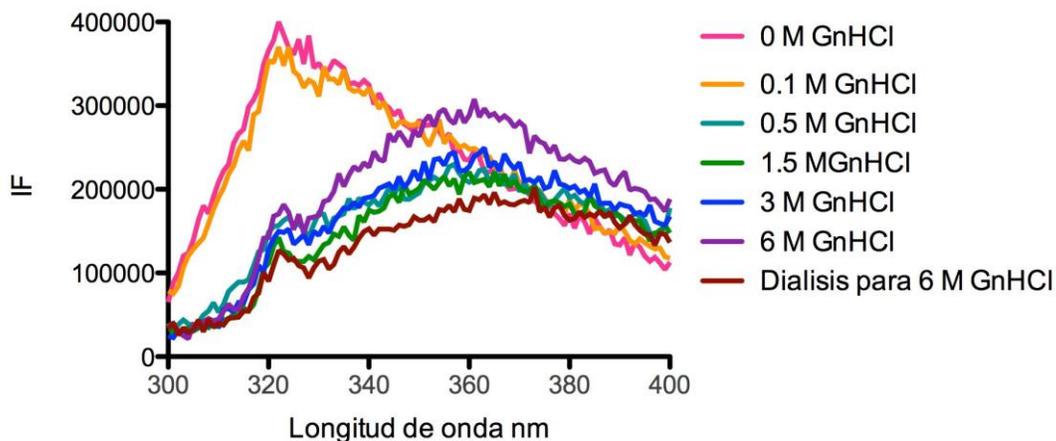


**Fig. 9.9 Superposición de los cromatogramas para las reacciones enzimáticas con glucógeno como sustrato.** Azul: Pico característico del glucógeno. Morado: Pico generado de la reacción de hidrólisis entre glucógeno y la enzima nativa. Rosa: Pico obtenido de la reacción de hidrólisis entre glucógeno y la enzima re-plegada después de ser desnaturalizada con GndHCl 3 M.

### 9.6.3 RE-PLEGAMIENTO ENZIMÁTICO SEGUIDO POR FLUORESCENCIA

Una manera de comprobar que la enzima se desnaturaliza completamente y logra re-plegarse de nuevo hasta llegar a su conformación original es por medio de sus espectros de fluorescencia en ambos estados. Para este experimento se probaron diferentes concentraciones de GndHCl para desnaturalizar la enzima, estimando a partir de qué punto está completamente desplegada. Durante el experimento se observó que la enzima ya no presentaba un espectro de fluorescencia similar al de la quimera nativa a partir de una concentración de 0.5 M de GndHCl. Por este motivo se tomó como único punto a dializar en amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7 el punto que contenía 6 M de GndHCl. Los resultados apuntan a que la enzima no logra re-plegarse correctamente (Fig. 9.10).

Desnaturalización de  $\alpha$ -GI-L6H a diferentes [GnHCl]



**Fig. 9.10 Espectros de fluorescencia de la  $\alpha$ -GI-L6H.** Tomando diferentes concentraciones de cloruro de guanidinio se analizó el comportamiento de la  $\alpha$ -GI-L6H mediante fluorescencia en el fluorómetro ISS a 290 nm de excitación en un rango de 300 a 400 nm. Mediciones realizadas en amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.

Para poder tener un mejor parámetro que correlacione la concentración de GndHCl y la desnaturalización de la enzima, a partir de los espectros de fluorescencia obtenidos (Fig. 9.10) se calculó el centro de masa espectral (SCM) para cada concentración de GndHCl. El resultado indica que, efectivamente, la enzima se despliega completamente después de 0.5 M de GndHCl (Fig. 9.11).

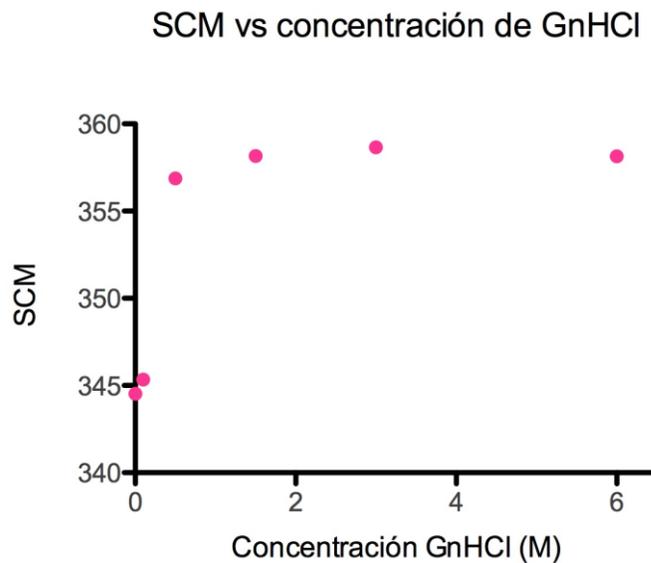
$$SCM = \frac{\sum(IF_{\lambda} * \lambda)}{\sum IF_0}$$

Donde:

$IF_{\lambda}$ : Intensidad de fluorescencia corregida por concentración proteica y amortiguador.

$\lambda$ : Longitud de onda de excitación.

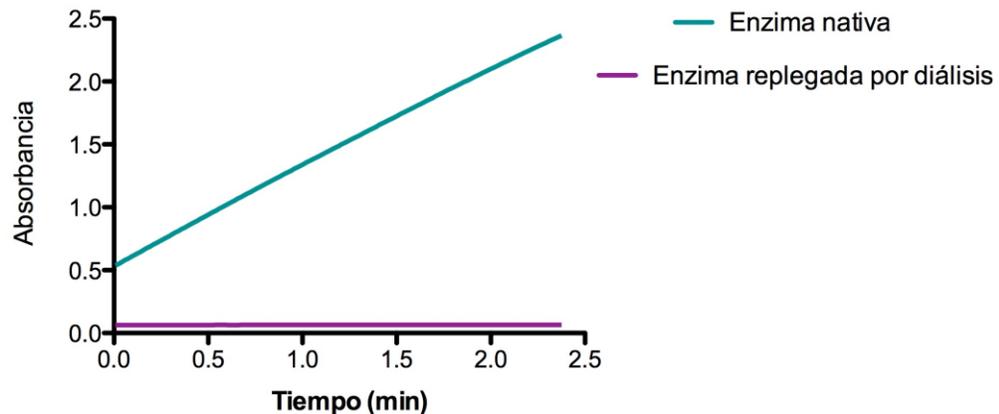
$IF_0$ : Intensidad de fluorescencia.



**Fig. 9.11 Gráfico SCM vs Concentración de GndHCl.** Se puede observar la gran diferencia en el SCM de la enzima nativa (concentración 0 de GndHCl) y los puntos de SCM a partir de la enzima desnaturalizada con 0.5 M de GndHCl. De igual manera se observa que después de 0.5 M de GndHCl ya no hay cambios conformacionales de la enzima.

Para continuar con los experimentos, se tomaron 2 muestras con 6 M de GndHCl las cuales se dializaron nuevamente, esta vez tomando en consideración que no quedara más de 0.1 M de GndHCl, para esto se utilizó una calculadora digital (disponible en: <http://sosnick.uchicago.edu/gdmcl.html>.) la cual utiliza el índice de refracción de la muestra antes y durante la diálisis, arrojando la concentración final de GndHCl presente en las alícuotas. De esta manera se garantizó que las trazas de desnaturante no siguieran afectando el correcto plegamiento de la enzima. En vez de obtener los espectros de fluorescencia para estas muestras dializadas se optó por realizar una prueba enzimática con sustrato cromogénico (pNPG) para medir la actividad catalítica recuperada, sin embargo, no se obtuvo respuesta favorable (Fig. 9.12).

#### Diferencias en la actividad catalítica de la $\alpha$ -GI-L6H nativa y re-plegada

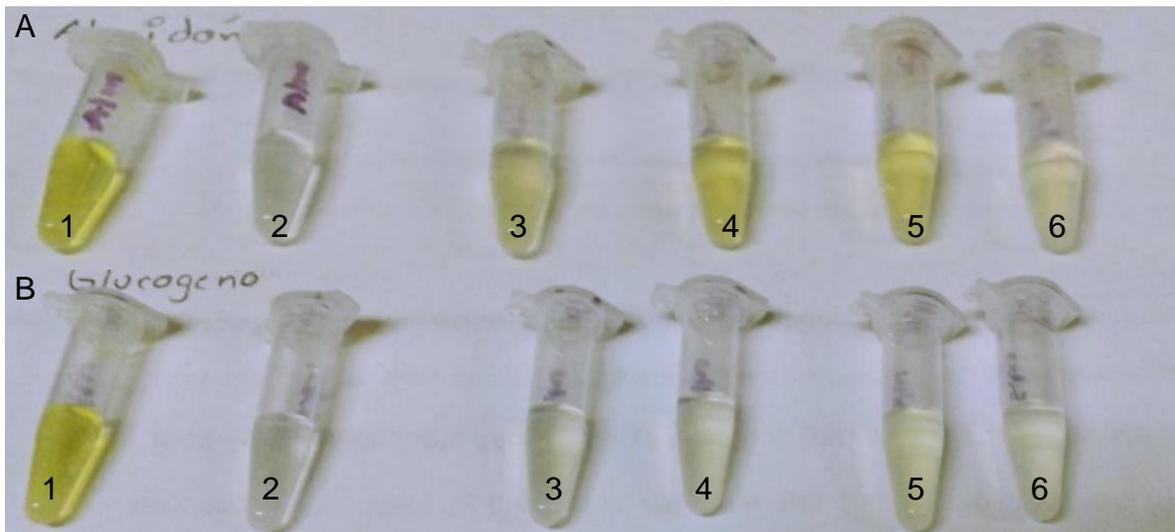


**Fig. 9.12 Gráfico de velocidades iniciales para la enzima nativa y re-plegada.** Se compararon las  $V_0$  para las reacciones enzimáticas con pNPG para la enzima quimérica nativa (línea azul) y la enzima desnaturada con 6 M de GndHCl y dializada contra amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7, utilizando IR como referencia para detener la diálisis (línea morada). Ambas utilizando como sustrato pNPG 5 mM a 30 °C y 405 nm.

Este resultado indica que la enzima aun cuando ya no está en presencia de concentraciones de GndHCl que pudieran afectar su correcto plegamiento (0.040 M) no recupera su estructura activa.

#### 9.6.4 RE-PLGAMIENTO ASISTIDO POR ALMIDÓN Y GLUCÓGENO

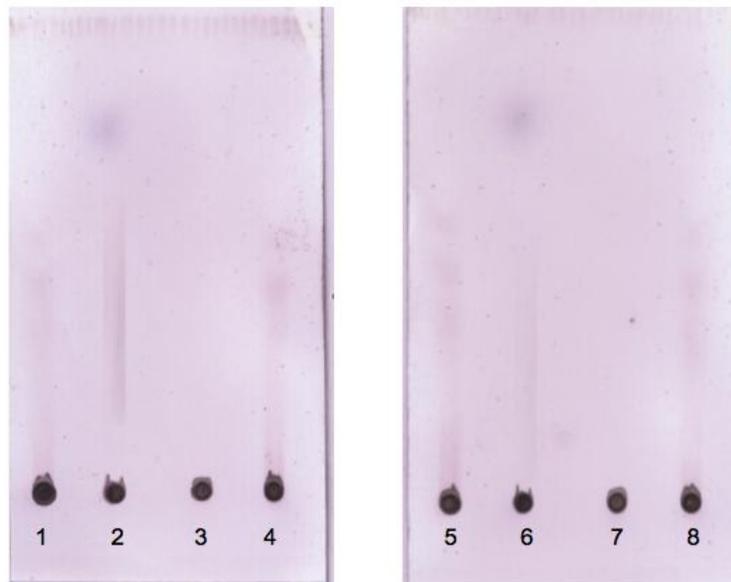
Una vez que se demostró que la gran mayoría de la población enzimática no regresa a su conformación nativa mediante diálisis con amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7, se intentó realizar un re-plegamiento asistido por sustrato (almidón y glucógeno), lo que pudiera ayudar a re-plegar correctamente el sitio activo.



**Fig. 9.13 Reacciones enzimáticas para pNPG (5 mM) re-plegando con diálisis asistida.** A) Diálisis asistida por almidón: (1) Enzima nativa + almidón + pNPG (Control +); (2) Amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7 + almidón + pNPG (Control -); (3 y 4) Enzima desnaturalizada con 3 M de GndHCl y re-plegada en amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7 con ayuda de almidón + pNPG; (5 y 6) Enzima desnaturalizada con 6 M de GndHCl y re-plegada en amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7 con ayuda de almidón + pNPG. B) Diálisis asistida por glucógeno: (1) Enzima nativa + glucógeno + pNPG (Control +); (2) Amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7 + glucógeno + pNPG (Control -); (3 y 4) Enzima desnaturalizada con 3 M de GndHCl y re-plegada en amortiguador de fosfatos 50 mm pH 7 con ayuda de glucógeno + pNPG; (5 y 6) Enzima desnaturalizada con 6 M de GndHCl y re-plegada en amortiguador de fosfatos 50 mM con ayuda de glucógeno + pNPG.

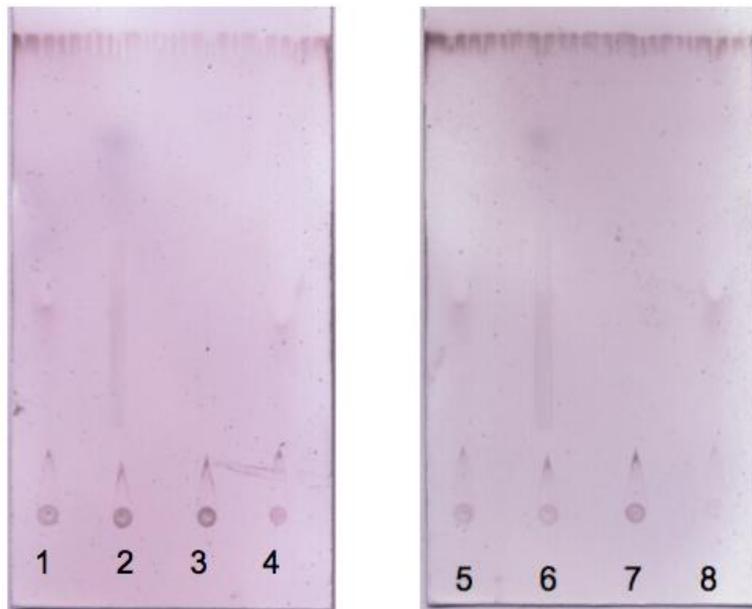
Para este experimento se tomaron duplicado muestras desnaturalizadas con 3 y 6 M de GndHCl (condiciones compatibles con el ensamble de VLPs de B19V). Después de la diálisis en presencia de almidón o glucógeno, se colocaron reacciones enzimáticas para ambos sustratos. Posteriormente se añadió pNPG para verificar la acción enzimática para sustratos pequeños (Fig. 9.13).

Como se puede observar en la Fig. 9.13 los re-plegamientos asistidos por almidón y glucógeno presentan actividad para el sustrato cromogénico, además de tener actividad catalítica para ambos sustratos seguidos por cromatografía en capa fina (Fig. 9.14 y Fig. 9.15).



**Fig. 9.14 Cromatografías en capa fina para las reacciones enzimáticas para almidón, incubadas con enzima re-plegada por diálisis asistida.** Las reacciones se colocaron 24 horas a 37 °C. Utilizando enzima que fue desnaturalizada y dializada en presencia de almidón contra amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7 (utilizando IR para seguir la diálisis). (1 y 4) Muestras de enzima desnaturalizada con 3 M de GndHCl y re-plegada en presencia de almidón + almidón. (2) Enzima nativa + almidón (Control +). (3) Almidón (Control -). (5 y 8) Enzima desnaturalizada con 6 M de GndHCl y re-plegada en presencia de almidón + almidón. (6) Enzima nativa + almidón (Control +). (7) Almidón (Control -).

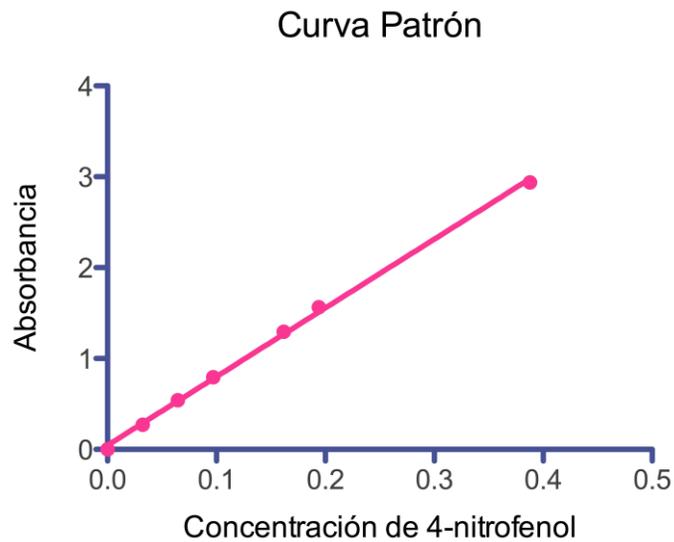
Cabe destacar que el re-plegamiento asistido por almidón muestra mejores resultados, lo que resulta conveniente ya que es un sustrato más económico y por tanto accesible. Se puede señalar que las pruebas que se realizaron dializando la enzima desnaturalizada únicamente contra amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7 no generaron subproductos visibles por cromatografía en capa fina para las reacciones enzimáticas con almidón y glucógeno, ni cambio de color para la catálisis del pNPG. Esto implica que, aunque de manera limitada la presencia del sustrato ayuda al re-plegamiento de la enzima.



**Fig. 9.15 Cromatografías en capa fina para las reacciones enzimáticas para glucógeno, incubadas con enzima re-plegada por diálisis asistida.** Las reacciones enzimáticas se colocaron por 24 horas a 37 °C. Utilizando enzima después de ser desnaturalizada y dializada en presencia de glucógeno contra amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7 (utilizando IR para seguir la diálisis). (1 y 4) Muestras de enzima desnaturalizada con 3 M de GndHCl y re-plegada en presencia de glucógeno + glucógeno. (2) Enzima nativa + glucógeno (Control +). (3) Glucógeno (Control -). (5 y 8) Enzima desnaturalizada con 6 M de GndHCl y re-plegada en presencia de glucógeno + glucógeno. (6) Enzima nativa + glucógeno (Control +). (7) Glucógeno (Control -).

### 9.7 DETERMINACIÓN DE LOS VALORES CINÉTICOS DE $\alpha$ -GI-L6H

Para determinar los valores cinéticos de la enzima se partió de obtener las velocidades iniciales de reacción de la  $\alpha$ -GI-L6H incubada con un compuesto cromogénico (pNPG) que permitiese seguir la reacción por espectrofotometría. Se realizaron lecturas a 405 nm utilizando diferentes concentraciones de pNPG, con una concentración de enzima de 0.40 nM en amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7 e incubando a 30 °C. Para poder comparar los resultados de las cinéticas fue necesario realizar una curva patrón del producto de hidrólisis del pNPG: 4-nitrofenol (Fig. 9.16).



**Fig. 9.16 Curva patrón de 4-nitrofenol.** Realizada con un patrón de 4-nitrofenol diluido en amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7 y leída a 405 nm incubando a 30 °C.

El experimento se realizó cuatro veces para tener datos estadísticos y los resultados se trataron de la siguiente manera:

Ecuación 1: Velocidad inicial ( $V_0$ )

$$v_0 = \frac{\text{Concentración de producto}}{\text{Tiempo}} = \frac{mM}{min} \quad (\text{Ec. 1})$$

Sustituyendo las pendientes de las curvas obtenidas: curva patrón de 4-nitrofenol (Abs/concentración) y curvas de cinéticas (Abs/tiempo) se tiene que:

$$v_0 = \frac{m \text{ cinetica}}{m \text{ curva patrón}} = \frac{\text{Concentración}}{\text{tiempo}} \quad (\text{Ec. 2})$$

Se calculó la  $V_0$  para las diferentes cinéticas realizadas, y graficando contra la concentración de sustrato, los promedios, se pueden ajustar a un modelo de inhibición por sustrato (Fig. 7.13). Esto se determinó al comparar las desviaciones estándar y  $r^2$  para el modelo de Michaelis-Menten y el modelo de inhibición por sustrato (Cuadro 9.4).

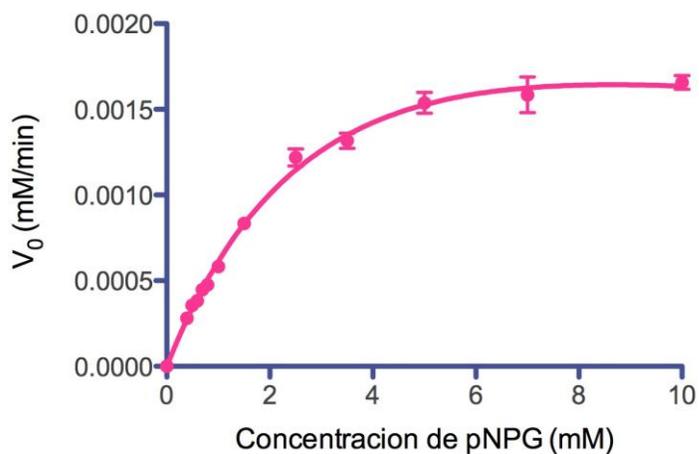
$$v_0 = \frac{v_{max} [S]}{K_m + [S]} \quad (\text{Ec. 3 Michaelis-Menten})$$

$$v_0 = \frac{v_{max} [S]}{[K_m + [S](1 + \frac{[S]}{K_i})]} \quad (\text{Ec. 4 Inhibición por sustrato})$$

**Cuadro. 9.4.** Comparación entre los posibles modelos de ajuste del gráfico de las  $V_0$  vs concentración de sustrato.

Modelo	$V_{max}$ (mM/min)	$R^2$	$K_m$ (mM)	$K_i$ (mM)
<b>Michaelis-Menten</b>	$0.0021 \pm 0.0436$	0.9726	$2.402 \pm 0.1760$	
<b>Inhibición por sustrato</b>	$0.0033 \pm 0.0004$	0.9796	$4.272 \pm 0.7861$	$17.55 \pm 6.670$

Ajuste al modelo de Inhibición por sustrato



**Fig. 9.17** Gráfico de inhibición por sustrato para la  $\alpha$ -GI-L6H. Obtenido al graficar las  $V_0$  (mM/min) vs concentración de pNPG (mM) en PRISMA.

Una vez que se reconoce a qué gráfico se ajustan mejor los resultados, se definen los valores mediante el programa PRISMA para la  $V_{max}$  con lo que se puede

calcular la constante de afinidad al sustrato ( $K_m$ ) y la constante de inhibición a sustrato ( $K_i$ ). Con estos datos podemos obtener las demás constantes cinéticas (Cuadro 9.5).

Para obtener la constante catalítica ( $k_{cat}$ ) se realizó el despeje de la definición matemática de  $V_{max}$  (Ecuación 5):

$$V_{max} = k_{cat} * [enzima] \quad (\text{Ec. 5})$$

Entonces:

$$k_{cat} = \frac{V_{max}}{[Enzima]} \quad (\text{Ec. 6})$$

Ya con estos parámetros se puede obtener además la eficiencia catalítica (Ecuación 7):

$$\text{Eficiencia catalítica} = \frac{k_{cat}}{K_m} \quad (\text{Ec. 7})$$

**Cuadro 9.5** Recopilación y cálculo de las constantes cinéticas para la  $\alpha$ -GI-L6H a partir del modelo de inhibición por sustrato.

	Enzima (mM)	$V_{max}$ (mM/min)	$k_{cat}$ (min <sup>-1</sup> )	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	$K_m$ (mM)	$k_{cat}/K_m$ (mM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	$K_i$ (mM)
<b><math>\alpha</math>-GI-L6H</b>	$0.40 \cdot 10^{-6}$	0.0033± 0.0004	8250	137.5	4.272± 0.786	32.18	17.55± 6.670

Al comparar los valores catalíticos obtenidos de la quimera  $\alpha$ -GI-L6H con los reportados por Deng y colaboradores, observamos que la quimera pierde afinidad

hacia el sustrato ( $K_m$ ), sin embargo, aumenta el número de recambios por unidad de tiempo ( $k_{cat}$ ) lo que por consiguiente eleva la medida de eficiencia catalítica ( $k_{cat}/K_m$ ) (Cuadro 9.6).

**Cuadro 9.6** Comparación de los valores obtenidos experimentalmente para la  $\alpha$ -GI-L6H. (amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7 y 30°C) y los reportados por Deng et. al. (amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7 a 37°C) para la enzima nativa de *S. cerevisiae* (IMA1p).

	$K_m$ (mM)	$k_{cat}$ ( $s^{-1}$ )	$k_{cat}/K_m$ ( $mM^{-1} s^{-1}$ )	$K_i$ (mM)
<b><math>\alpha</math>-GI-L6H</b>	4.2	137.5	32.1	17.55
<b>IMA1p</b>	0.6 $\pm$ 0.2	8.7 $\pm$ 1.0	15.0 $\pm$ 6.0	25.0 $\pm$ 15.0

## 9.8 CINÉTICA DE INACTIVACIÓN DE $\alpha$ -GI-L6H EN CONDICIONES EX-VIVO Y LISOSOMALES

Para calcular las constantes de inactivación enzimáticas se consideró que la enzima solo presenta dos estados conformacionales: nativo (N) con actividad catalítica y desnaturalizado (D) carente de actividad enzimática. En donde la transición de N a D está dada por la reacción:



En este proceso la velocidad está mediada tanto por la constante de inactivación como por la concentración de la enzima en estado nativo (Ecuación 8):

$$v = k_i [N] \quad (\text{Ec. 8})$$

La velocidad también podemos expresarla en términos de la aparición de enzima desnaturalizada en razón del tiempo (Ecuación 9):

$$\frac{d[D]}{dt} = k_i [N] \quad (\text{Ec. 9})$$

Que de igual manera se puede expresar en función de la desaparición de la enzima nativa (Ecuación 10):

$$-\frac{d[N]}{dt} = k_i [N] \quad (\text{Ec. 10})$$

Al separar variables en la ecuación anterior se obtiene (Ecuación 11):

$$-\frac{d[N]}{[N]} = k_i dt \quad (\text{Ec. 11})$$

Integrando la ecuación 11 se tiene (Ecuación 12):

$$\int -\frac{d[N]}{[N]} = k_i \int dt \quad (\text{Ec. 12})$$

Y para los límites 0 y t (Ecuación 13):

$$-\ln \frac{[N]_t}{[N]_0} = k_i t \quad (\text{Ec. 13})$$

En este caso, la concentración inicial de la enzima es proporcional a la actividad enzimática en el tiempo 0 ( $Act_0$ ), ya que en este punto, la enzima en estado nativo posee actividad. Bajo esta premisa, la concentración de la enzima en estado nativo en cualquier otro tiempo (t) es proporcional a la actividad catalítica en ese momento ( $Act_t$ ). Por lo tanto se tiene que:

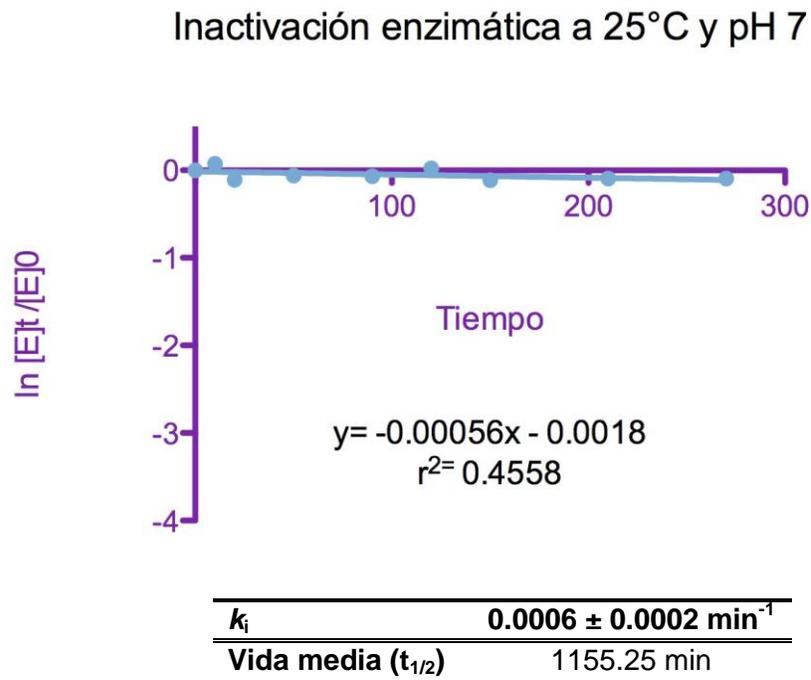
$$\ln \frac{Act_t}{Act_0} = -k_i t \quad (\text{Ec. 14})$$

Para poder obtener el valor de  $k_i$  se graficó  $\ln (Act_t/Act_0)$  contra el tiempo. Por lo tanto la pendiente de este gráfico equivale a  $-k_i$ . Los tiempos de vida media se estimaron en base a las  $k_i$  obtenidas (Ecuación 15):

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_i} \quad (\text{Ec. 15})$$

Las  $k_i$  de la quimera  $\alpha$ -G-L6H se realizaron en dos condiciones diferentes: *ex vivo* (25 °C y pH 7) y lisosomales (37 °C y pH 5).

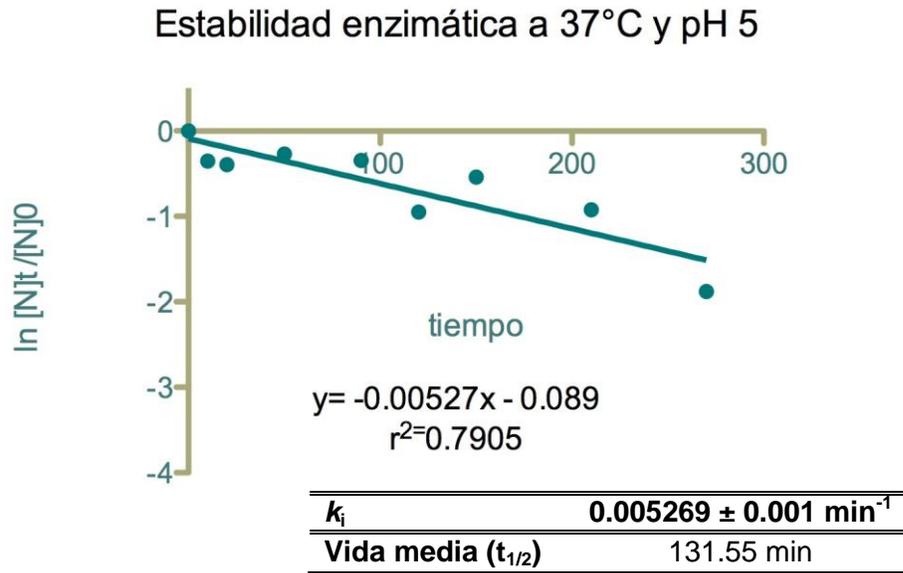
Para los experimentos se utilizó la misma concentración de enzima que en experimentos pasados ( $0.40 \times 10^{-6}$  mM), utilizando una concentración de pNPG de 5 mM disuelto ya sea en amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7 o amortiguador de acetatos 50 mM pH 5, respectivamente y realizando lecturas en el espectrofotómetro a 405 nm. Las mediciones se realizaron en un periodo de 0 a 270 min, obteniendo que en condiciones *ex vivo* la  $\alpha$ -GI-L6H tiene una vida media de 19 horas y media aproximadamente, ya que no presenta cambios conformacionales que provoquen que se pierda la actividad catalítica (Fig. 9.18).



**Fig. 9.18 Gráfico de Inactivación enzimática de la  $\alpha$ -GI-L6H en condiciones ex-vivo.** Realizado a 25 °C en amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7. Tomando mediciones en el espectrofotómetro CARY a 405 nm a diferentes tiempos de incubación.

En el caso de la estabilidad conformacional de la quimera en condiciones lisosomales se puede observar que el aumento de temperatura y la disminución del pH si generan cambios que provocan la pérdida de la actividad enzimática. En este caso la vida media de la enzima es de 2 horas aproximadamente (Fig. 9.19).

Los resultados apuntan a que la quimera de la isomaltasa de *S. cerevisiae* sí presenta actividad catalítica en condiciones lisosomales y es capaz de hidrolizar sustratos grandes como son el almidón y el glucógeno, por lo que sigue siendo una opción como propuesta de fármaco para enfermedades de almacenamiento lisosomal de glucógeno al ser anclada a VLPs del B19V.



**Fig 9.19 Gráfico de inactivación enzimática de la  $\alpha$ -GI-L6H en condiciones lisosomales.** Realizando a 37 °C y en amortiguador de acetatos 50 mM pH 5. Tomando mediciones en el espectrofotómetro CARY a 405 nm a diferentes tiempos de incubación.

En el caso específico de la  $\alpha$ -GI-L6H, este anclaje no podría ser realizado por los métodos propuestos por Santillán y colaboradores debido a la casi nula recuperación estructural de la enzima después de ser desnaturalizada en las condiciones de ensamble *in vitro* de las VLPs del B19V. Sin embargo, el método propuesto por Santillán *et al.* no es el único descrito para anclaje de péptidos o proteínas en las superficies de las VLPs.

## 10. CONCLUSIONES

Se comprobó que la  $\alpha$ -GI-L6H tiene actividad catalítica contra almidón y glucógeno en condiciones *ex vivo* y lisosomales, además de presentar una buena estabilidad en estas condiciones. En condiciones lisosomales hay que mencionar que el tiempo de vida media es menor que en condiciones *ex vivo*. Sin embargo, el objetivo de presentar la  $\alpha$ -GI-L6H sobre VLPs no solo es para transportarla, sino también, para otorgarle un mayor tiempo de estabilidad.

Después de la desnaturalización de la  $\alpha$ -GI-L6H en condiciones óptimas para el ensamble *in vitro* de VLPs del B19V, el re-plegamiento enzimático no ocurre correctamente, es decir, que la mayor parte de la enzima replegada mediante diálisis no presenta actividad catalítica para sustratos de alto peso molecular (almidón y glucógeno), ni para sustratos pequeños (pNPG). Sin embargo, también se demostró que al efectuar un re-plegamiento mediante diálisis en presencia de almidón se mejora razonablemente la catálisis para todos los sustratos.

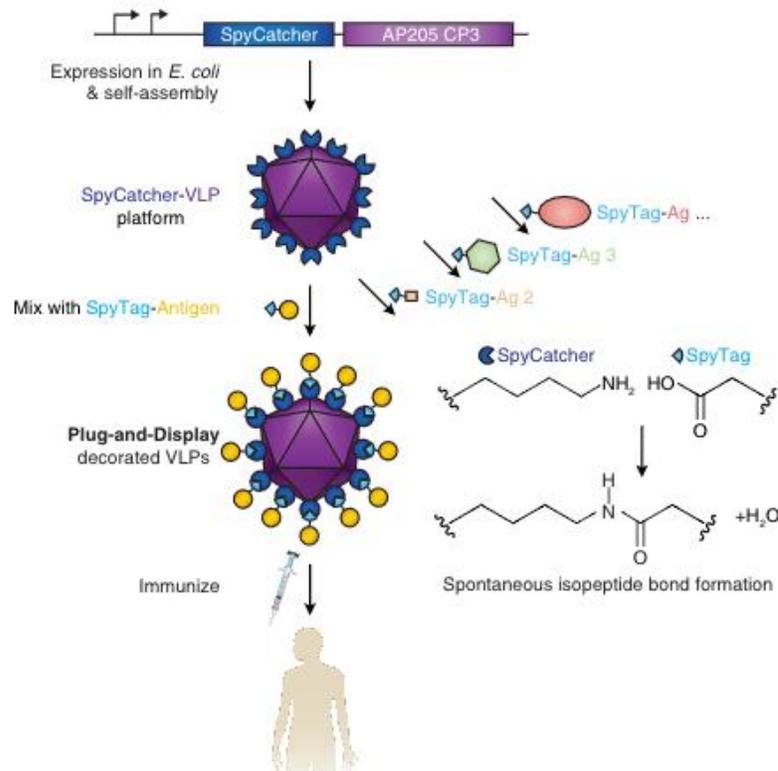
Se caracterizó cinéticamente a la quimera, encontrando que la adición de un péptido espaciador en el extremo C-terminal y la etiqueta de histidinas repercute ligeramente en los parámetros cinéticos, como la constante de afinidad ( $K_m$ ) que se ve disminuida. Sin embargo, el número de recambio ( $k_{cat}$ ) aumenta, por lo que la eficiencia enzimática ( $k_{cat}/K_m$ ) aumenta. Esto último sugiere que esta enzima podría ser un buen catalizador al estar unida a la superficie de las VLPs.

## 10.1 PERSPECTIVAS

Teniendo en cuenta el resultado de un mejor re-plegamiento asistido por almidón, la idea de realizar la fusión de los plásmidos para generar la quimera entre  $\alpha$ -GI-L6H y VP2, y posteriormente ensamblar *in vitro* las VLPs podría funcionar siempre y cuando se logre dializar las VLPs formadas adicionando almidón al amortiguador sin causar la precipitación de las partículas.

Comprobando que las condiciones de diálisis asistida por almidón posterior al ensamble de VLPs no funciona, se propone intentar con otro método para anclar a la isomaltasa a las VLPs. Este método desarrollado por Brune y colaboradores describe la producción de VLPs ligadas a un péptido receptor (SpyCatcher-VLP) y la enzima de interés modificada con el dominio de reconocimiento del receptor SpyCatcher ( $\alpha$ -GI-SpyTag)<sup>38</sup>. Posteriormente, al combinar estas proteínas en condiciones que a ninguna de las dos afecte, (amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7) se generará la unión mediante un enlace isopeptídico entre el SpyTag y el SpyCatcher (Fig. 10.1).

Una vez logrado en anclaje de la isomaltasa a las VLPs del B19V, se tendría que volver a caracterizar la enzima, comprobando que presenta actividad catalítica para glucógeno y almidón, que sus parámetros cinéticos son adecuados, y demostrar que el anclaje mejora considerablemente la estabilidad enzimática en condiciones lisosomales.



**Fig 10.1 Anclaje de antígenos a VLPs.** Mediante la presentación de receptores unidos a la VLP y a la molécula en cuestión. Tomado de Brune *et al.*, 2016.

Además, sería necesario probar el modelo en líneas celulares que presenten acumulación de glucógeno completo y no des-ramificado, para comprobar que la enzima puede ser de utilidad para las enfermedades de Pompe y/o de Cori-Forbes.

## 11.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lehninger. D. L, Cox. M. M. Principles of biochemistry. 5<sup>a</sup> ed. USA: W.H. Freeman an Company; 2008.
2. Voet. D, Voet. J. G. *Bioquímica. 3<sup>a</sup> edición. Rondinone. S, Klajn. D, Preciado. M.V., trad. Buenos Aires. Argentina: Editorial Médica Panamericana; 2006*
3. Correa. Q. J. Nomenclatura y clasificación de las enzimas. Universidad Nacional de Colombia. 2012
4. Polaina. J. Estructura, función e ingeniería molecular de enzimas implicadas en la digestión de carbohidratos. Mensaje Bioquímico. 2004;28: 61-76.
5. Davies. G, Henrissat. B. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. Minireview. 1995; 3(9): 853-859.
6. Tagami. T, Okuyama. M, Nakai. H, Kim. Y.M, Mori. H, Taguchi. K, Svensson. B, Kimura. A. Key aromatic residues at subsites +2 and +3 of glycoside hydrolase family 31  $\alpha$ -glucosidase contribute to recognition of long-chain substrates. BBA. 2013; 1834(1): 329-335.
7. Yamamoto. K, Miyake. H, Kusunoki. M, Osaki. S. Crystal structures of isomalasa from *Saccharomyces cerevisiae* and in complex with its competitive inhibitor maltose. FEBS J. 2010; 277(20): 4205-4214.
8. Deng. X, Petitjean. M, Teste. M. A, Kooli. W, Tranier. S, François. J. M, Parrou. J.L. Similarities and differences in the biochemical and enzymological properties of the four isomaltases from *Saccharomyces cerevisiae*. FEBS Open Bio. 2014; 4(1): 200-212.
9. Yamamoto. K, Nakayama. A, Yamamoto. Y, Tabata. S. Va216 decides the substrate specificity of  $\alpha$ -glucosidase in *Saccharomyces cerevisiae*. FEBS Eur. J. Biochem. 2004; 271: 3414-3420.
10. Rivera. M. H, López-Mungía. A, Soberon. X, Saab-Rincón. G.  $\alpha$ -Amylase from bacillus licheniformis mutants near to the catalytic site: effects on hydrolytic and transglycosylation activity. Protein Engineering. 2003; 16(7): 505-514.
11. Klein. A. D, Futerman. A. H. Lysosomal storage disorders: old diseases, present and future challenges. PER. 2013; 11(1): 395-399.
12. Fan. J. Q. A contradictory treatment for lysosomal storage disorders: inhibitors enhance mutant enzyme activity. TRENDS. 2003; 24(7): 355-360.
13. Desnick. R. J, Schuchman. E. H. Enzyme replacement therapy for lysosomal diseases: Lessons from 20 years of experience and remaining challenges. Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. 2012; 13: 307-335.

14. Yoo. J.W, Irvine. D.J, Discher. D.E, Mitragotri. S. Bio-inspired, bioengineered and biomimetic drug delivery carriers. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2011; 10: 521- 535.
15. Cardinale. D, Carette. N, Michon. T. Virus scaffolds as enzyme nano-carriers. *Trends in Biotechnology.* 2012; 30(7): 369-376.
16. Donath. E, Fischlechner. M. Viruses as building blocks for materials and devices. *Angew. Chem.* 2007; 46(18): 3184-3193.
17. Kaufmann. J. K, Nettelbeck. D. M. Virus cheeras for gene therapy, vaccination, and oncolysis: adenoviruses and beyond. *Trends in Molecular Medicine.* 2012; 18(7): 365-376.
18. Gilbert. L et al. Molecular and structural characterization of florescent human parvovirus B19 virus-like particles. *BBRC.* 2005; 331: 527-535.
19. Keer. J. R, Cotmore. S. F, Bloom. M. E, Linden. R. M, Parrish. C. R. *Parvoviruses.* Hodder Arnold; U.S.A, 2006.
20. Costa. L. et al. Parvovirus B19 1A complete genome from a fatal case in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2015; 110(6): 820-821.
21. Sanchez. R. S. P. et al. Human parvovirus B19 virus-like particles: In vitro assembly and stability. *Biochimie.* 2012; 94: 870-878.
22. Brown. C. S, Van Lent. J. W, Vlask. J. M, Spaan. W. J. Assembly of empty capsids by using baculovirus recombinants expressing human parvovirus B19 structural proteins. *J. VIROL.* 1991; 65(5): 2702-2706.
23. Amexis. G, Young. N. S. Parvovirus B19 empty capsids as antigen carriers for presentation of antigenic determinants of Dengue 2 virus. *JID.* 2006; 194: 790-794.
24. Sedlik. C. et al. Intranasal delivery of recombinant parvovirus-like particles elicits citotoxic T-cell and neutralizing antibody responses. *J. VIROL.* 1999; 73(4): 2739-2744.
25. Gilbert. L. et al. Molecular and structural characterization of fluorescent human parvovirus B19 virus-like particles. *BBRC.* 2005; 331: 527-535.
26. Gutierrez. L. I. A. Estudio de la quimera formada por la proteína VP2 de Parvovirus B19 y la Lipasa de *Bacillus pumilus* [Tesis]. México, D.F: UNAM. Facultad de Química; 2014.
27. Santillán. J. S, Valadez. J, Morán. A, Santillán. H. C, Bustos. J. I. Peptide display on a surface loop of human parvovirus B19 VP2: Assembly and characterization of virus-like particles. *Virus Research.* 2015; 201:1-7.
28. Ballabio. A, Gieselmann. V. Lysosomal disorders: From storage to celular demage. *BBA.* 2009; 1793(4): 684-696.
29. Wraith. J.E. Lysosomal disorders. *Semin Neonatol.* 2002; 7(1): 75-83.

30. Platt. F. M, Boland. B, van der Spoel. A. C. Lysosomal storage disorders: The cellular impact of lysosomal dysfunction. *JCB*. 2012; 199(5): 723-734.
31. Kishnani. P. S. et al. Pompe disease diagnosis and management guideline. *ACMG*. 2006; 8(5): 267-288.
32. Mellies. U, Lofaso. F. Pompe disease: A neuromuscular disease with respiratory muscle involvement. *Respiratory Medicine*. 2009; 103: 477-484.
33. An. Y, Young. S. P, Hillman. S. L, Van Hove. J. L, Chen. Y, Millington. D. S. Liquid chromatographic assay for glucose tetrasaccharide, a putative biomarker for the diagnosis of Pompe disease. *Analytical Biochemistry*. 2000; 287: 136-143.
34. Umapathysivam. K, Hopwood. J. J, Meikle. P. J. Determination of  $\alpha$ -glucosidase activity in blood spots as a diagnostic test for Pompe Disease. *Clinical Chemistry*. 2001; 47(8): 1378-1383.
35. Kishnani. P. S. et al. Glycogen storage disease type III diagnosis and management guidelines. *Genetics in medicine*. 2010; 12: 446-465.
36. Orphanet [Home page in internet]. Inserm: Froissart. R; 2009c [actualizada 01 Junio 2016; consultado 01 junio 2016]. Disponible en: <http://www.orpha.net/>
37. Lakowicz. J. R. Principles of fluorescence spectroscopy. 3<sup>a</sup> ed. USA: Springer; 2010.
38. Brune. K. D. et al. Plug-and-Display: decoration of Virus-Like Particles via isopeptide bonds for modular immunization. *Scientific reports*. 2016; 6(19234): 1-13.