



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**CARACTERIZACIÓN DEL DESPLEGAMIENTO Y COMPORTAMIENTO CINÉTICO DE
UNA PROTEÍNA DIMÉRICA PARA SU USO COMO HERRAMIENTA EN LA
EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA CAPACIDAD CALORÍFICA SOBRE LA CATÁLISIS
ENZIMÁTICA**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias**

**PRESENTA:
EKATERINA JALOMO KHAYROVA**

**TUTOR PRINCIPAL
DRA. GLORIA SAAB RINCÓN
[Instituto de Biotecnología-UNAM](#)**

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

**DRA. NINA PASTOR COLÓN
[Universidad Autónoma del Estado de Morelos](#)**

**DR. AGUSTÍN LÓPEZ-MUNGUÍA CANALES
[Instituto de Biotecnología-UNAM](#)**

Cuernavaca, Morelos. Septiembre, 2020



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:

Dr. Edmundo Castillo Rosales
Presidente

Dr. Adán Oswaldo Guerrero Cárdenas
Secretario

Dra. Rosario Muñoz Clares
Vocal

Dra. Mariana Peimbert Torres
Vocal

Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco
Vocal

El presente proyecto de tesis de maestría se desarrolló bajo dirección de la Dra. Gloria Saab Rincón en el laboratorio de Ingeniería de Proteínas del departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la UNAM, bajo el programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas.

Para la realización del mismo se contó con el financiamiento del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica PAPIIT/UNAM a través de los proyectos IT200617 e IN211020. Además, se realiza un amplio reconocimiento al Programa de Apoyo a los Estudiantes del Posgrado (PAEP) por todos los apoyos otorgados.

Este trabajo se realizó gracias a la beca de CONACyT para estudios de posgrado nivel maestría, con número de becario 888563

Dedicatoria

A Dios, a la vida, a mi familia y amigos.

Apunta a la luna. Incluso si fallas aterrizarás entre las estrellas.

Agradecimientos académicos

A la **Dra. Gloria Saab Rincón**, por todo el apoyo y confianza. Por ser la guía en todo este tiempo, por compartir su experiencia y conocimiento. Por atreverse a explorar nuevas líneas de investigación y darme la oportunidad de formar parte de eso.

A los miembros del consorcio **SOS** por las grandes aportaciones al proyecto en las diferentes etapas del mismo. Al **Dr. Humberto Flores** y la **Dra. Wendy Xolalpa** por estar disponibles y apoyar con su experiencia y conocimiento durante el día a día en el laboratorio, así como en las presentaciones de seminario.

A los miembros de mi comité tutorial: **Dra. Nina Pastor Colón** y **Dr. Agustín López-Munguía Canales** por las observaciones y comentarios en cada examen.

Al grupo de **Biocatálisis** por sus valiosas aportaciones durante los seminarios de grupo.

A la **Ing. Leticia Olvera** por todo apoyo técnico recibido. Al personal de apoyo: **Don Toño** y **Cori**, que siempre tenían a nuestra disposición el laboratorio limpio, medios de cultivo, material limpio y estéril. A la **C.P. Rubí Robledo** por su gran apoyo en las cuestiones administrativas.

A las diferentes unidades del IBt: **docencia, computo, biblioteca, servicios generales, síntesis de oligos y secuenciación de DNA** y **sus respectivos miembros**, por facilitar el trabajo día a día. Un agradecimiento muy especial al **Lic. Antonio Bolaños** por su gran apoyo durante toda esta etapa.

A los miembros del jurado evaluador: **Dr. Edmundo Castillo**, **Dr. Adán Guerrero**, **Dra. Rosario Clares**, **Dra. Mariana Peimbert** y **Dr. Alejandro Fernández**, por sus observaciones y comentarios que permitieron enriquecer la calidad de esta tesis. Un agradecimiento especial a la **Dra. Rosario Clares** por la revisión tan minuciosa.

Al **Programa de Apoyo a los Estudiantes de Posgrado (PAEP)**, por el apoyo económico para la asistencia a congresos nacionales e internacionales.

Al **Instituto de Biotecnología (IBt)** y a la **Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)**.

Agradecimientos personales

Todo este proceso tuvo sus altas y bajas. Fue un camino lleno de satisfacciones y frustraciones, pero todo acompañado de mucho aprendizaje. Como en la vida, hay personas que hicieron que este camino fuera más acogedor y en algunos casos más desafiante pero mucho más fructífero, por eso les quiero agradecer.

Primero a *Dios*, por permitirme llegar hasta esta etapa de la vida y por darme todas esas herramientas y oportunidades para encontrarme en este sitio, tanto profesionalmente como personalmente.

A *mis papás: Alla y Martín, y a mi hermano Martín*, porque siempre han sido ese gran pilar. Me han apoyado en cada una de mis decisiones y aunque a veces, algunas no les parecieran las más adecuadas, seguían estando ahí para mí. Porque a pesar de estar a varios kilómetros de mí, siempre se preocupaban y ocupaban de que estuviera lo mejor posible.

A la *Dra. Gloria Saab*, por depositar su confianza en mí, en alguien que no conocía y aun así se atrevió a ofrecerme tremendo proyecto. Porque durante todo este tiempo me brindo muchísima confianza y lo que más le agradezco, mucha autonomía. Por todo el apoyo que me dio desde el comienzo.

Gracias a esta aventura llamada maestría, encontré a un compañero de vida increíble. *Fidel* gracias por estar ahí desde el día uno, disfrazado de amigo. Gracias por animarme todo el tiempo, por compartir conmigo tantas cosas y ahora aparte de una bonita amistad, compartir tu vida conmigo. Gracias por estar siempre para escucharme y regañarme cuando estoy haciendo dramas sin sentido. Gracias por todo.

A los *miembros del laboratorio 9*, por compartir risas, alegrías, momentos divertidos, estresantes, muchos de ellos frustrantes pero que gracias a la convivencia diaria se sobrellevan de la mejor manera. Gracias por compartir su experiencia y conocimiento. También a todos los compañeros que conocí en el IBT: a mis *compañeros de generación* por los viajes y festejos que hicimos juntos, a mis *amigos de otra generación*, por haberme aceptado como si hubiera entrado con ustedes, por recibirme de una forma muy bonita y hacerme sentir cuidada. Y esto fue gracias a *Jorge*, que me incluyó a la bonita familia que había conocido, desde antes de estar aceptada en el posgrado. Jorge muchas gracias por tanto apoyo desde siempre, por conocerme tan bien y saber cómo actuar en las diversas situaciones, por ser ese gran hermano que siempre se preocupa por mí. Que nunca se nos olvide, “De aquí al estrellato”.

Un agradecimiento muy especial también al *Dr. Marco Ramos* y a la *Dra. Rosy Mares*. En la maestría las cosas fueron menos complicadas gracias al gran soporte y aprendizaje que me dieron en etapas iniciales de mi camino como investigadora, porque, además de técnicas experimentales, fomentaron en mi un perfil de dedicación, responsabilidad y autocrítica que me fue muy útil. A la *familia Biotec* por seguir siendo parte de mi vida personal y hacerme sentir muy querida cada que regresaba a Tijuana.

A la mejor prima, que además es mi mejor amiga, *Sara*, por siempre estar en contacto, por buscar de una y mil maneras que esta bella relación siga creciendo y que las experiencias compartidas cada vez sean más especiales. A *mis galanes: Celina, Verito y Eliseo*, por seguir tan al pendiente de mí y por hacer un espacio en su agenda cada que andaba por aquellos rumbos.

Y a todos los que han estado a mi lado durante toda mi vida, han contribuido a formar la persona que soy ahora. Muchas gracias.

Contenido

Dedicatoria	3
Agradecimientos académicos	4
Agradecimientos personales	5
Contenido	6
Índice de figuras y tablas.....	8
Abreviaturas.....	10
Resumen	11
1. INTRODUCCIÓN.....	12
2. ANTECEDENTES	14
2.1. Proteínas.....	14
2.1.1. Estructura de proteínas	14
2.1.2. Plegamiento de proteínas	15
2.1.2.1. Interacciones que favorecen el plegamiento	16
2.1.2.2. Factores termodinámicos que intervienen en el plegamiento.....	17
2.1.3. Desnaturalización de proteínas.....	18
2.1.4. Dinámica de proteínas	18
2.2. Catálisis enzimática.....	19
2.2.1. Dependencia de la actividad enzimática de la temperatura	20
2.2.2. Teoría de la velocidad macromolecular (MMRT).....	21
2.2.3. Capacidad calorífica en proteínas.....	22
2.2.4. Cambio en la capacidad calorífica (ΔC_p) y temperatura óptima (T_{opt}).....	23
2.2.5. Relación entre la masa y la actividad catalítica.....	26
2.2.6. Sustitución isotópica como herramienta para estudiar el comportamiento enzimático	27
3. JUSTIFICACIÓN	29
4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	30
4.1. Hipótesis	30
4.2. Objetivo general.....	30
4.3. Objetivos específicos	30
5. MATERIALES.....	31
5.1. Reactivos biológicos y químicos	31
5.1.1. Reactivos químicos y bioquímicos	31
5.1.2. Enzimas y otros reactivos biológicos	31
5.1.3. Estuches comerciales	31
5.2. Células bacterianas y medios de cultivo	32
5.3. Plásmidos.....	32
6. MÉTODOS.....	35
6.1. Búsqueda informática	35
6.2. Preparación de células electrocompetentes	35
6.3. Preparación de células quimiocompetentes	35
6.4. Transformación y selección bacteriana	36
6.5. Electroforesis en gel de agarosa	36
6.6. Expresión de proteínas.....	36
6.7. Extracción de proteínas periplásmicas	37
6.8. Purificación mediante afinidad a metales.....	37
6.9. Separación de proteínas mediante SDS-PAGE	37

6.10.	Separación de proteínas en condiciones nativas	38
6.11.	Cuantificación de proteínas	38
6.12.	Diálisis de la proteína	39
6.13.	Cromatografía de exclusión molecular	39
6.14.	Análisis de la estructura secundaria	40
6.15.	Análisis de la estructura tridimensional	40
6.16.	Ajuste de datos a modelos matemáticos.....	41
6.17.	Ensayos de desplegamiento y replegamiento	43
6.18.	Análisis de la actividad enzimática	44
6.19.	Análisis de parámetros termodinámicos	45
6.20.	Construcción de pET28- <i>PaCif</i> -MBP y pDPM73- <i>PaCif</i> -D129S-6His.....	45
6.20.1.	pET28- <i>PaCif</i> -MBP	45
6.20.2.	pDPM73- <i>PaCif</i> -D129S-6His.....	46
7.	RESULTADOS Y DISCUSIONES	48
7.1.	Enzimas homodiméricas	48
7.2.	Epóxido hidrolasa de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (<i>PaCif</i>)	55
7.3.	Construcción de pDPM73- <i>PaCif</i> -6His	56
7.4.	Expresión de <i>PaCif</i>	57
7.5.	Caracterización del estado oligomérico de la proteína.....	62
7.6.	Desplegamiento y reversibilidad del plegamiento de <i>PaCif</i>	64
7.7.	Caracterización cinética de <i>PaCif</i>	77
7.8.	Caracterización de la actividad enzimática con respecto a la temperatura	80
7.9.	Construcción de pET28- <i>PaCif</i> -MBP	81
7.10.	Construcción de pDPM73- <i>PaCif</i> -D129S-6His	85
7.11.	Expresión y caracterización de la variante <i>PaCif</i> D129S	87
8.	CONCLUSIONES.....	89
9.	PERSPECTIVAS	90
10.	BIBLIOGRAFÍA.....	91

Índice de figuras y tablas

Figura 2-1. Representación de la termodinámica del plegamiento en forma de embudo	17
Figura 2-2. Diagrama de coordenadas de una reacción sin catalizador y con catalizador	20
Figura 2-3. Efecto de la mutación en T_{opt} , ΔC_p^\ddagger , y parámetros Michaelis-Menten de la α -glucosidasa MaIL.....	24
Figura 2-4. Representación de las simulaciones de dinámica molecular de MaIL silvestre, V200S y G202P.....	25
Figura 2-5. Relación entre la masa molecular de una enzima contra la velocidad de reacción	27
Figura 2-6. Efecto de la sustitución isotópica en ΔC_p^\ddagger	28
Figura 5-1. Representación esquemática del plásmido pDPM73- <i>PaCif</i> -6His.....	33
Figura 5-2. Representación esquemática del plásmido pET-28a(+)......	34
Figura 5-3. Representación esquemática del plásmido pET MBP mOrange LIC	34
Figura 6-1. Representación esquemática de la reacción de epóxido hidrolasa	44
Figura 7-1. Representación de la fluoroacetato deshidrogenasa	49
Figura 7-2. Representación de la β -Glucosidasa de <i>Streptomyces</i>	50
Figura 7-3. Representación de la Succinato hidrolasa de <i>Mesorhizobium japonicum</i>	51
Figura 7-4. Representación de la Est1E (Esterasa) de <i>Butyvirbio proteoclasticus</i>	52
Figura 7-5. Representación de la Monoacilglicerol lipasa de <i>Homo sapiens</i>	53
Figura 7-6. Representación de la Epóxido hidrolasa de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	54
Figura 7-7. Representación esquemática del gen PA14_26090	55
Figura 7-8. Representación de una subunidad de epóxido hidrolasa.....	56
Figura 7-9. Análisis molecular del plásmido pDPM73- <i>PaCif</i> -6His	57
Figura 7-10. Análisis de expresión de la proteína secretada <i>PaCif</i> en <i>E. coli</i> Top 10	58
Figura 7-11. Análisis de expresión de la proteína <i>PaCif</i> en el contenido celular de <i>E. coli</i> Top 10.....	58
Figura 7-12. Proteína purificada del medio Terrific Broth de <i>E. coli</i> Top 10.....	59
Figura 7-13. Análisis de expresión de la proteína <i>PaCif</i> en medio mínimo	60
Figura 7-14. Análisis de presencia <i>PaCif</i> en espacio periplásmico de <i>E. coli</i> Top 10	61
Figura 7-15. Análisis del estado oligomérico de <i>PaCif</i> por PAGE nativo	63
Figura 7-16. Curva estándar para el análisis del estado oligomérico de <i>PaCif</i> por cromatografía de exclusión molecular	64
Figura 7-17. Espectro de dicroísmo circular de <i>PaCif</i>	66
Figura 7-18. Curva de desplegamiento de <i>PaCif</i> con urea	66
Figura 7-19. Desplegamiento con urea de <i>PaCif</i>	67

Figura 7-20. Ubicación de triptófanos en <i>PaCIF</i>	68
Figura 7-21. Curva de desplegamiento de <i>PaCIF</i> con cloruro de guanidinio	73
Figura 7-22. Curvas de desplegamiento con cloruro de guanidinio de <i>PaCIF</i>	74
Figura 7-23. Desplegamiento con cloruro de guanidinio de <i>PaCIF</i>	75
Figura 7-24. Perfil de replegamiento de <i>PaCIF</i> con L-arginina.....	76
Figura 7-25. Curva estándar de 0-2.7 mM 3-bromo-1,2-propanodiol	77
Figura 7-26. Análisis de la actividad enzimática de <i>PaCIF</i> variando la concentración de sustrato.....	78
Figura 7-27. Ajuste Michaelis-Menten de <i>PaCIF</i> a diversas temperaturas	79
Figura 7-28. Efecto de la temperatura en la catálisis enzimática y en la estructura secundaria de <i>PaCIF</i> ...	80
Figura 7-29. Representación de los distintos productos de PCR para el gen de <i>PaCIF</i>	82
Figura 7-30. Representación del producto de PCR del gen de MBP.....	83
Figura 7-31. Análisis del producto de PCR de <i>PaCIF</i> y MBP.....	84
Figura 7-32. Representación esquemática del plásmido pET28- <i>PaCif</i> -MBP.....	84
Figura 7-33. Análisis molecular del plásmido pET28- <i>PaCIF</i> -MBP	85
Figura 7-34. Análisis del producto de PCR de megaprimer	86
Figura 7-35. Análisis del producto de PCR de <i>PaCIF</i> D129S	86
Figura 7-36. Comparativo entre <i>PaCIF</i> silvestre y D129S	87
Figura 7-37. Curvas de desnaturalización térmica de <i>PaCIF</i>	88
Tabla 5-1. Genotipos de las cepas de <i>E. coli</i> utilizadas en el estudio.....	32
Tabla 6-1. Oligonucleótidos utilizados en el estudio.....	46
Tabla 7-1. Proteínas evaluadas que cubren características deseadas.....	48
Tabla 7-2. Análisis del estado oligomérico de <i>PaCIF</i> por cromatografía de exclusión molecular	64
Tabla 7-3. Datos termodinámicos del desplegamiento	69
Tabla 7-4. Parámetros catalíticos de <i>PaCIF</i> a diversas temperaturas.....	79
Tabla 7-5. Parámetros termodinámicos de <i>PaCIF</i>	81

Abreviaturas

°C	Grados Centígrados
μF	Microfaradio
BPD	3-Bromo-1,2-propanodiol
CD, DC	Dicroísmo circular
CFTR	Regulador de la conductancia transmembranal de la fibrosis quística
DO ₆₀₀	Densidad óptica a 600 nm
EBH	Epibromohidrina
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
k _{cat}	Constante catalítica
kDa	Kilodalton
K _M	Constante de Michaelis-Menten
kV	Kilovoltio
L-Arg	L-Arginina
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani
MBP	Proteína de unión a maltosa
ml, μl	Mililitro; Microlitro
mM	Milimolar
MMRT	Teoría de velocidad macromolecular
ng, pg	Nanogramos; Picogramos
nm	Nanómetros
<i>PaCIF</i>	Factor inhibitorio de CFTR de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
pb/bp	Pares de bases
PDB	Protein Data Bank
PEP	Fosfoenolpiruvato
PGA	2-fosfo-D-glicerato
Rpm	Revoluciones por minuto
SDS-PAGE	Electroforesis de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes
TB	Medio Terrific-Broth
T _m	Temperatura de desnaturalización
T _{opt}	Temperatura óptima
UFC	Unidades formadoras de colonias
V _{max}	Velocidad máxima
V _{max} /K _M	Eficiencia catalítica
ΔCp	Cambio en la capacidad calorífica
ΔH [‡]	Entalpía de activación
ΔS [‡]	Entropía de activación

Resumen

La catálisis enzimática tiene una gran dependencia de la temperatura y es estudiada con las ecuaciones de Arrhenius y Eyring. Estas logran explicar el comportamiento cinético con respecto a la temperatura, hasta llegar a una temperatura en donde se alcanza el máximo de actividad, conocida como temperatura óptima (T_{opt}). Posterior a ella la catálisis enzimática cae repentinamente, y esto ha sido explicado con el inicio de la desnaturalización de la proteína. Sin embargo, se ha demostrado que existen enzimas que muestran este comportamiento con respecto a la temperatura, sin sufrir alteraciones en la estructura tridimensional de la misma. Para dar explicación a lo anterior se ha desarrollado la teoría de la velocidad macromolecular, la cual considera que el cambio en la capacidad calorífica entre el complejo enzima-sustrato, en estado basal y en estado de transición (ΔC_p^\ddagger), tiene una contribución en la catálisis. Se ha intentado evaluar el efecto ΔC_p^\ddagger en diversos estudios, y aunque se han obtenido resultados interesantes, solo dan lugar a especulaciones. Se sabe que, el cambio en las frecuencias de los modos vibracionales está ampliamente relacionado con el ΔC_p^\ddagger . Por lo que se propone alterar la frecuencia de los modos vibracionales, en una enzima que permita analizar los cambios generados en la actividad enzimática. Se plantea utilizar un modelo homodimérico en el cual una subunidad presentará las alteraciones vibracionales y la otra subunidad actuará de reportera. Para ello es necesario contar con dicho modelo caracterizado estructural y cinéticamente, por esta razón, en este trabajo se presenta la caracterización de la enzima dimérica que se utilizará en estudios futuros.

Es necesario que la enzima cuente con ciertas características tanto estructurales como cinéticas, por lo que la primera parte del proyecto consistió en una búsqueda bibliográfica de las posibles enzimas diméricas, seleccionando a la epóxido hidrolasa de *Pseudomonas aeruginosa* (*PaCIF*) como candidata. Al no contar con estudios de desnaturalización de esta enzima, se procedió a evaluar el perfil de desplegamiento por agentes caotrópicos, mediante dicroísmo circular y fluorescencia intrínseca de triptófanos. Se encontró que se requieren altas concentraciones de cloruro de guanidinio para lograr desnaturalizar la enzima, además, se encuentra un intermediario aparentemente monomérico en etapas finales del desplegamiento. Posteriormente se buscaron las condiciones que favorecieran el replegamiento de la enzima; esto se obtuvo con el uso de L-arginina, logrando la recuperación de ~ 50% de la actividad enzimática. El efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática se analizó mediante un ajuste a la ecuación de Michaelis-Menten. La constante catalítica k_{cat} obtenida a diferentes temperaturas, se comparó con el perfil de desplegamiento térmico de la proteína, para asegurar que el comportamiento enzimático no estuviera siendo afectado por la pérdida de estructura de la proteína. Encontrando que la enzima, tiene una temperatura óptima de 34 °C, mientras que la temperatura media de desnaturalización (T_m) es de 60.6 °C. Con estos datos se pudo concluir que la enzima *PaCIF* puede ser utilizada como modelo de estudio para la evaluación del efecto del ΔC_p^\ddagger en la catálisis enzimática.

1. INTRODUCCIÓN

La estructura tridimensional de una proteína determina la naturaleza de la misma. Según el ordenamiento que muestren los átomos que la conforman, la proteína muestra la función que puede desempeñar, así como la estabilidad que mostrará frente a diferentes factores desnaturizantes como temperatura u agentes químicos. Las enzimas son proteínas capaces de acelerar una reacción química, y como toda reacción química, se puede ver favorecida o perjudicada por la temperatura.

La catálisis enzimática tiene una fuerte dependencia de la temperatura, mostrando una temperatura óptima (T_{opt}) en la cual se alcanza el máximo de actividad. A temperaturas por debajo de la óptima, el comportamiento enzimático con respecto a la temperatura se explica con las ecuaciones de Arrhenius y Eyring. Por arriba de la temperatura óptima, se observa un decaimiento en la constante de velocidad de reacción del paso limitante, que se ha atribuido a la desnaturización de la enzima, en la cual pierde su estructura tridimensional y como consecuencia su función enzimática. Sin embargo, análisis cuidadosos han demostrado que en algunas enzimas la desnaturización comienza varios grados arriba de la temperatura óptima. Por ello se ha propuesto la teoría de la velocidad macromolecular (MMRT) en la que se explica la dependencia de la catálisis enzimática de la temperatura, con un rearrreglo matemático de la ecuación de Eyring en la que se incorporan los parámetros termodinámicos, cambio en la entalpía de activación (ΔH^\ddagger), cambio en la entropía de activación (ΔS^\ddagger) y cambio en la capacidad calorífica de activación (ΔC_p^\ddagger)

El ΔC_p^\ddagger es una propiedad termodinámica que describe la diferencia de la capacidad calorífica entre el estado basal y el estado de transición del complejo enzima-sustrato. La capacidad calorífica de una enzima, en parte, está dada por sus modos vibracionales, los cuales están íntimamente relacionados con la dinámica de la enzima, y por su número pueden ser los que contribuyan mayoritariamente a la diferencia de capacidad calorífica entre el estado basal y el de transición en la reacción catalizada. Por lo que se busca evaluar su efecto sobre la catálisis enzimática mediante una alteración en la frecuencia de los modos vibracionales. Para ello es necesario contar con un modelo enzimático que permita el análisis de dicho efecto, sin afectar directa o indirectamente el sitio catalítico. Se propone que el modelo sea una enzima dimérica, en la que una subunidad sea catalíticamente inactiva y se exprese con isótopos pesados para causar una variación en la frecuencia de los modos vibracionales, los cuales se espera que generen un cambio en la capacidad calorífica. Esto se podrá detectar mediante la otra subunidad que actuará como reportera de la actividad.

Para contar con dicho modelo es necesario que la proteína presente ciertas características. Una de ellas es, que la disociación del dímero se logre en condiciones específicas (agentes desnaturizantes) y no en condiciones nativas. Esto se debe a que es indispensable contar con una sola población heterodimérica (posterior a su purificación) en la cual no exista intercambio de subunidades. Se requiere que la enzima cuente con un plegamiento reversible, ya que posterior a su desnaturización se pretende utilizar una mezcla equimolar de cada subunidad (silvestre y catalíticamente silenciada expresada con isótopos pesados) para la formación del heterodímero. Se busca que la proteína no dependa de cofactores, y no presente modulación alostérica, ya que podrían ser variantes que estén modificando la actividad enzimática y se espera que el cambio observado sobre la catálisis sea solo por el efecto del cambio de frecuencias vibracionales. Otra característica que se desea, es que la enzima muestre un comportamiento cinético dependiente de la temperatura, pero que en ese intervalo de temperatura no esté involucrada la desnaturización de la proteína. Es decir, se busca que la temperatura a la que ocurre la desnaturización de la proteína sea superior al intervalo en el que se observa la típica disminución en la curva de actividad enzimática dependiente de temperatura.

En el presente trabajo se pretende establecer el modelo homodimérico que será utilizado como herramienta para demostrar la contribución del cambio de capacidad calorífica en la catálisis. Al requerir que la enzima presente varias condiciones específicas, se han encontrado varios modelos que parecen ser adecuados, pero no se cuenta con la caracterización completa. Por lo que este proyecto propone caracterizar el perfil de desplegamiento y replegamiento de una proteína dimérica, así como el efecto de la temperatura sobre el comportamiento enzimático.

2. ANTECEDENTES

2.1. Proteínas

Las proteínas son macromoléculas presentes en todos los organismos vivos. Tienen una amplia variedad de funciones: estructurales, reguladoras, catalíticas, etc., por lo que en la naturaleza encontramos una gran diversidad. Son biopolímeros compuestos de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos, que según la forma en la que se ordenen confieren las tan variadas características de una proteína [Whitford *et al.*, 2013]. En la naturaleza existen 20 aminoácidos que pueden combinarse para brindar características importantes a las proteínas, por sí solos presentan propiedades fisicoquímicas y estructurales que permiten que existan diferencias en tamaño, carga, hidrofobicidad y reactividad química, lo que causa la diversidad y versatilidad de las proteínas [Berg *et al.*, 2002]. Los aminoácidos son de suma importancia para la estructura de una proteína, ya que son éstos y sus interacciones los que definen el plegamiento, la función, la estabilidad, en pocas palabras son los que definen a una proteína.

2.1.1. Estructura de proteínas

La función de una proteína depende directamente de su estructura tridimensional y para explicarla se han utilizado 4 niveles de estructuración. La primera, conocida como estructura primaria, consiste en la secuencia lineal de aminoácidos que conforman a la proteína. Debido a la naturaleza planar de los enlaces peptídicos de la cadena proteica, existen solo dos configuraciones posibles para este enlace, *cis* y *trans*. La mayoría de los enlaces peptídicos de proteínas son *trans* debido a que en esta posición se evitan los choques estéricos entre cadenas laterales.

La proteína comienza con la formación de las estructuras secundarias, en las cuales están involucrados los átomos de la cadena principal, sin tomar en cuenta la orientación de las cadenas laterales o la interacción de estas con otros segmentos. Son pocas las estructuras secundarias estables que se pueden encontrar en las proteínas. Las más destacables son las hélices α y hojas β . En las hélices α se observa un ordenamiento de forma helicoidal alrededor de un eje imaginario, las cadenas laterales están orientadas hacia el exterior del esqueleto de la hélice. Una hélice α regular muestra 3.6 residuos por giro con una distancia de 1.5 Å entre dos carbonos α [Berg *et al.*, 2002]. El giro es dextrógiro en casi todas las proteínas. Esta estructura es muy estable debido a los puentes de hidrógeno que se forman entre el hidrógeno del nitrógeno amídico y el oxígeno del grupo carbonilo del aminoácido que se encuentra cuatro posiciones antes del primero. A pesar de que estas interacciones ocurren entre átomos de la cadena principal, existen ciertos residuos o conjuntos de estos que desestabilizan o impiden la formación de

hélices α . Estos residuos son principalmente glicina por su alta flexibilidad y prolina por su gran rigidez y ausencia de un átomo de hidrógeno en el nitrógeno de la amida. Cuando se tienen residuos contiguos con cadenas laterales con la misma carga, estos tienden a repelerse, impidiendo así la formación de la hélice. A diferencia de las hélices α , las hojas β se encuentran extendidas en forma de zig-zag. Para que ocurra este tipo de estructura es necesario que dos o más regiones de la cadena polipeptídica (conocidas como hebras o unidades individuales de la hoja β) se encuentren de forma paralela o antiparalela. En esta conformación, la distancia entre aminoácidos es de 3.5 Å y las cadenas laterales se orientan al exterior de la hoja β , también en forma de zig-zag. Según la orientación de las unidades individuales que conforman la hoja β , pueden ser paralelas o antiparalelas (la orientación de amino-carboxilo es la misma o la opuesta, respectivamente). La estabilización se consigue mediante puentes de hidrógeno entre el hidrógeno del nitrógeno amídico de una unidad individual con el oxígeno del carbonilo de la unidad opuesta. Aunque existen otro tipo de estructuras secundarias, las más frecuentes y estables son las descritas anteriormente.

Mientras que la estructura secundaria solo contempla el ordenamiento de los átomos de las cadenas principales, la estructura terciaria involucra las interacciones de todos los átomos. Para obtener una estructura terciaria estable es necesario que los grupos de las cadenas laterales interactúen según la proteína en cuestión. Las principales interacciones que favorecen la estructura tridimensional son los agrupamientos de residuos polares o apolares según en el medio que se encuentren en la proteína, mediante puentes de hidrógeno e interacciones tipo van der Waals. En algunas proteínas las cisteínas juegan un papel importante mediante la formación de enlaces disulfuro que estabilizan a la estructura de la proteína. Además, existen proteínas que presentan una estructura cuaternaria, ésta consiste en interacciones no covalentes entre dos o más cadenas polipeptídicas, las cuales pueden ser iguales o diferentes [Nelson & Cox, 2009]. Este último nivel de estructuración, permite la formación de proteínas complejas y más grandes. En algunos casos las proteínas tienden a agruparse de esta forma para lograr una mayor estabilidad, en otros se consiguen funciones que una sola subunidad no presenta [Chebotareva et al., 2016].

2.1.2. Plegamiento de proteínas

El plegamiento es un proceso fundamental para las proteínas, ya que determina la función y estabilidad de la proteína; un mal plegamiento conduce a proteínas disfuncionales, que, en sistemas biológicos, frecuentemente son degradadas. A pesar del amplio número de estudios, aún no se ha logrado

explicar el proceso de plegamiento de proteínas en su totalidad. Sin embargo, se han determinado ciertos factores importantes en el proceso de plegamiento.

2.1.2.1. Interacciones que favorecen el plegamiento

“La secuencia lineal de aminoácidos determina la conformación tridimensional de la proteína” [Anfinsen, 1973]. En los primeros estudios reportados sobre el plegamiento de proteínas, se logró demostrar que la secuencia primaria determina la estructura terciaria de la proteína gracias a experimentos con ribonucleasa A; en los cuales una proteína desnaturalizada (en este caso la ribonucleasa en contacto con agentes caotrópicos y agentes reductores) fue capaz de recuperar su función biológica al remover los agentes causantes de la desnaturalización. Indicando así que las interacciones que mantienen la estructura tridimensional sólo dependen de la estructura primaria de la proteína y que no se requieren de factores internos en la célula para la recuperación de la actividad enzimática. Estas interacciones son de diversa índole, encontrándose que las que dominan el plegamiento son las interacciones hidrofóbicas y las electrostáticas.

Las interacciones hidrofóbicas dirigen el plegamiento de proteínas. Los residuos aminoácidos no polares, al entrar en contacto con una solución acuosa se protegen del agua, generando núcleos hidrofóbicos que aumentan la estabilidad de la proteína y que limitan el número de conformaciones que la cadena polipeptídica tendría que explorar para llegar al estado nativo. Posteriormente el núcleo hidrofóbico se estabiliza, principalmente a través de puentes de hidrógeno entre residuos aminoácidos o con el solvente acuoso [Dill et al., 2008]. Otras interacciones que juegan un papel importante en el plegamiento de proteínas son las electrostáticas entre residuos cargados. Se ha visto que estas, gracias a su capacidad de atracción y repulsión, favorecen rutas específicas durante el plegamiento. Las interacciones electrostáticas entre cargas opuestas suelen contribuir a la estabilidad del plegamiento, debido a que este tipo de interacciones pueden conservarse aún a distancias entre 5 y 10 Å [Zhou & Pang, 2018]. Existen otros tipos de interacciones, como los son los enlaces covalentes entre cisteínas que generan puentes disulfuro, pueden o no existir en el plegamiento, según la presencia e interacción entre cisteínas; este tipo de interacciones confieren mayor estabilidad a la forma nativa de la proteína [Wedemeyer et al., 2000].

2.1.2.2. Factores termodinámicos que intervienen en el plegamiento

La representación del paisaje termodinámico del proceso de plegamiento está relacionada con la paradoja de Levinthal, la cual ofrece una explicación a porqué el plegamiento ocurre espontáneamente y en escalas muy cortas de tiempo. Para encontrar el estado nativo es necesario que la proteína atraviese una serie de pasos bien definidos, ya que, si explorara todas las conformaciones posibles, el tiempo de plegamiento sería astronómico. Esta serie de pasos permite que la proteína alcance un estado metaestable de plegamiento en un tiempo corto [Levinthal, 1968]. Posteriormente se postuló esta paradoja en forma de embudo de energía libre [Dill & Chan, 1997], en donde la parte superior del embudo representa los estados no plegados, los cuales se caracterizan por un alto grado de entropía conformacional y energía libre. Conforme el plegamiento avanza, el número de conformaciones posibles disminuye, causando una reducción en la energía libre y en la entropía de la proteína. De manera que todas las rutas de plegamiento originales, empiezan a converger en estructuras de intermediarios, a partir de los cuales, la mayoría de las moléculas continúan con la misma ruta de plegamiento y un estado de transición común. Mientras continúa avanzando el plegamiento, se observa la presencia de pequeñas depresiones al rededor del embudo, estas representan intermediarios semiestables, que al verse reducido el embudo van disminuyendo, ya que alcanzan el estado de energía adecuado para mantener una única conformación nativa estable (Figura 2-1).

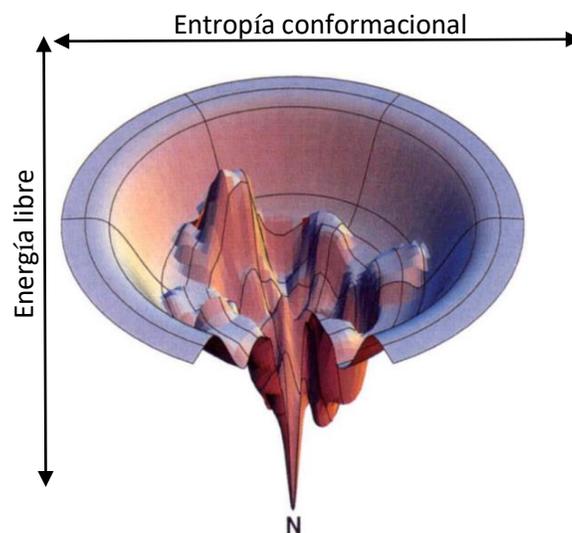


Figura 2-1. Representación de la termodinámica del plegamiento en forma de embudo

D: Proteína desnaturalizada; I: Intermediario proteico; N: Estado nativo de la proteína.

Modificado de Dill & Chan, 1997.

2.1.3. Desnaturalización de proteínas

La desnaturalización es el proceso por el cual una proteína nativa sufre cambios estructurales que causan la pérdida de la actividad. Muchas veces se debe a que las condiciones del medio desfavorecen la estructura tridimensional mediante ruptura de diversos tipos de interacciones, estas condiciones pueden ser temperatura, cambios en pH, agentes químicos como urea, cloruro de guanidinio, detergentes, agentes reductores, etc. [Nelson & Cox, 2009].

Existen diferencias entre el concepto de desnaturalización y desplegamiento de proteínas. Una proteína desnaturalizada es aquella que presenta una conformación inactiva funcionalmente, que tiene variaciones entre las interacciones que confieren el estado nativo y el estado no nativo. Mientras que una proteína desplegada es la forma en la que se encuentra la cadena polipeptídica al someterse a condiciones altamente desnaturalizantes, lo que se refleja en la pérdida de interacciones que favorecen el estado nativo de la proteína [Walters et al., 2009].

El desplegamiento de una proteína se puede alcanzar mediante el uso de agentes que desfavorecen al estado nativo, como lo puede ser la temperatura, cambios en pH, detergentes o agentes caotrópicos. El mecanismo por el que actúan los agentes caotrópicos como urea o cloruro de guanidinio sigue siendo muy controversial. Dos teorías son las más estudiadas, la primera establece un mecanismo indirecto en el cual estos agentes cambian las propiedades del solvente (usualmente agua) y reducen la magnitud del efecto hidrofóbico por una interacción favorable con residuos hidrofóbicos, causando una desestabilización del estado nativo [Makhatadze & Privalov, 1992]. La segunda abarca un mecanismo directo, en el cual, los agentes desnaturalizantes interactúan con ciertos grupos funcionales de las proteínas, compitiendo con los puentes de hidrógeno intra-proteína. Los agentes caotrópicos forman fácilmente puentes de hidrógeno, esto, aunado a que existe evidencia en donde estas moléculas interactúan con la cadena polipeptídica [Seelig 2018], permite asumir que logran desnaturalizar la proteína mediante una alteración entre los puentes de hidrógeno que estabilizan a la misma.

2.1.4. Dinámica de proteínas

Las proteínas no son entes estáticos como nos lo sugieren las estructuras cristalográficas que nos ayudan a definir su plegamiento. En realidad, se encuentran en constante movimiento, adoptando una serie de conformaciones que se encuentran en equilibrio. La energía del sistema varía de acuerdo con los ángulos de enlace, a las longitudes de enlace, a la distribución de la carga y a la orientación y polarización de las moléculas que lo conforman [Nagel & Klinman, 2006]. La dinámica varía entre cada

proteína ya que existen un gran número de movimientos, los más comunes son los electrónicos, traslacionales, rotacionales y vibracionales [Arcus et al., 2016]. Siendo estos últimos los que se encuentran en mayor proporción, teniendo una posibilidad de $3N - 6$ modos vibracionales, donde N es el número de átomos de la proteína; esto se deduce ya que cada átomo tiene 3 grados de libertad debido a las coordenadas en las que se encuentra (X, Y y Z). Del total de grados de libertad ($3N$) de la dinámica de una proteína, 6 corresponden a movimientos rotacionales (3) y traslacionales (3), de la molécula sobre los ejes X, Y y Z. Esto arroja un amplio intervalo de frecuencias que corresponden a diversas escalas de tiempo, desde picosegundos para vibraciones de enlace, hasta microsegundos para movimientos de flexión tipo bisagra [Nagel & Klinman, 2006].

Se considera que la dinámica es una propiedad fundamental de las proteínas y de su mecanismo enzimático. La mayoría de las conformaciones que adquiere una proteína se encuentran en un estado energético metaestable, sin embargo, para llegar a este estado energético es necesario que atraviese por diversos estadios [Callender & Dwyer, 2014].

2.2. Catálisis enzimática

Uno de los principales grupos de proteínas son las enzimas, que actúan como catalizadores para acelerar reacciones químicas. Algunas enzimas actúan sin necesidad de un grupo químico adicional a los que contienen los aminoácidos que las componen, hay muchas otras que requieren de grupos adicionales como metales o ciertas moléculas orgánicas, conocidos como cofactores [Berg et al., 2002]. El plegamiento es un proceso muy importante para todas las proteínas, incluyendo a las enzimas, ya que requiere el posicionamiento correcto de los residuos que actuarán durante la catálisis, así como los residuos involucrados en el anclaje del sustrato o la unión de cofactores. Las enzimas logran modificar las velocidades de reacción, pero no alteran el equilibrio de reacción, es decir la relación que existe entre la energía libre del sustrato y del producto en su estado basal no se ve afectada por la presencia de un catalizador enzimático. Entre los estados basales del sustrato y producto existe una barrera energética, la cual representa la energía mínima requerida para el acomodo de las moléculas a reaccionar. Para ello, es necesario que se lleve a cabo el ordenamiento de enlaces, de grupos reactivos, formación de cargas transitorias, así como otras transiciones necesarias para llevar a cabo la reacción. En la cima de la barrera energética, las moléculas llegan a un estado de máxima energía, denominado estado de transición. En este estado las moléculas han sufrido las transformaciones necesarias para llevar a cabo una reacción y la probabilidad de que las moléculas regresen a sustrato o formen producto es la misma. Mientras más grande sea esta energía de activación más lenta es la reacción. La manera en

que las enzimas aumentan la velocidad de reacción es mediante la disminución de la energía de activación (Figura 2-2), la barrera que deben atravesar las moléculas para llegar al estado de transición se ve disminuida [Nelson & Cox, 2009]. Esto se logra debido a los diversos mecanismos que tienen las enzimas, algunos favorecen el correcto acomodo de las moléculas a reaccionar, en otros se crea el ambiente adecuado para que los sustratos o los intermediarios de reacción puedan ser estables, o incluso la misma enzima puede estabilizar a algún intermediario mediante diferentes tipos de interacciones [García-Viloca et al., 2004], esto por mencionar algunos de los mecanismos que logran la disminución de la energía de activación.

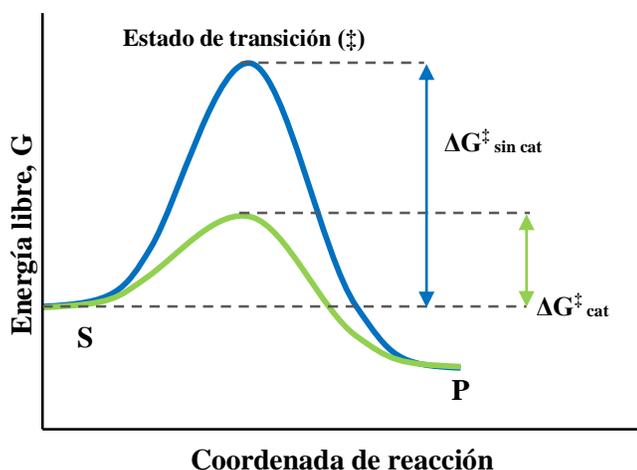


Figura 2-2. Diagrama de coordenadas de una reacción sin catalizador y con catalizador

La curva azul representa la reacción sin catalizador mientras que la curva verde la reacción con catalizador. S: Sustrato; P: Producto.

Existen ciertos factores que pueden favorecer o afectar la velocidad de las reacciones catalizadas enzimáticamente, algunos de ellos son la temperatura, el pH, concentración de enzima o sustrato, presencia de moléculas que actúen como inhibidores.

2.2.1. Dependencia de la actividad enzimática de la temperatura

Todas las reacciones catalizadas enzimáticamente, alcanzan el máximo de actividad a determinada temperatura, la cual se denomina temperatura óptima (T_{opt}), El incremento de la velocidad de reacción en función de la temperatura se explica con las ecuaciones de Arrhenius (1) y Eyring (2),

$$k(T) = Ae^{-\frac{Ea}{RT}} \quad (eq\ 1)$$

$$k = \frac{k_B \cdot T}{h} \cdot e^{-\frac{\Delta H^\ddagger}{RT}} \cdot e^{-\frac{\Delta S^\ddagger}{R}} \quad (eq\ 2)$$

Donde k es la constante de velocidad (dependiente de temperatura), A es el factor de frecuencia, Ea la energía de activación, R la constante universal de los gases, T la temperatura absoluta, k_B la constante de Boltzmann, h la constante de Planck, ΔH^\ddagger la entalpía de activación y ΔS^\ddagger la entropía de activación. La ecuación de Arrhenius establece que toda reacción química es dependiente de la temperatura y además requiere de una energía de activación para que se lleve a cabo [Laidler, 1984]. Posteriormente Eyring y Polanyi desarrollaron la teoría del estado de transición, la cual explica la constante de velocidad de reacción de las reacciones químicas. Esta teoría asume que existe un equilibrio químico entre los reactivos y el estado de transición. Se representa mediante la ecuación de Eyring, la cual incorpora las constantes de Planck y Boltzmann; así como el cambio en la energía libre de Gibbs (ΔG^\ddagger), debido a su relación con la constante de equilibrio de reacción. A su vez el ΔG^\ddagger se puede descomponer en sus parámetros termodinámicos entalpía y entropía de activación [Truhlar, 2015].

Ambas ecuaciones han sido utilizadas para describir el comportamiento de una enzima. Sin embargo, si seguimos la trayectoria esperada de la velocidad, supondríamos que, a altas temperaturas, la constante de velocidad de reacción siguiera incrementándose como sucede en una reacción no catalizada enzimáticamente. Sin embargo, se ha visto que, en reacciones catalizadas enzimáticamente, posterior a la T_{opt} la actividad enzimática se ve disminuida. Este comportamiento suele ser explicado con el inicio de un proceso de desnaturalización térmica de la enzima.

2.2.2. Teoría de la velocidad macromolecular (MMRT)

Existen ciertas enzimas en las que la caída de actividad a altas temperaturas no puede ser atribuida a la desnaturalización de la enzima. Tal es el caso de varias enzimas psicrófilas y termófilas, las cuales tienen una temperatura de desnaturalización (T_m) mucho más alta que la temperatura óptima [Hobbs et al., 2013] que, a diferencia de enzimas mesófilas, permiten que mantengan su estructura en un gran intervalo de temperatura, aunque no sea el más favorecido funcionalmente. Para explicar este comportamiento, en 2013 Hobbs y colaboradores propusieron la teoría de la velocidad macromolecular (MMRT). La cual explica la dependencia de la constante de velocidad de reacción catalizada por enzimas de la temperatura, involucrando una temperatura de referencia en ausencia de la

desnaturalización e incluyendo el concepto de cambio de la capacidad calorífica a lo largo de la reacción [Kamp *et al.*, 2018]. Para explicar este fenómeno, se toma en consideración el cambio entrópico y su dependencia de la temperatura mediante la siguiente ecuación:

$$\ln(k) = \ln\left(\frac{k_B T}{h}\right) - \frac{[\Delta H_{T_0}^\ddagger + \Delta C_p^\ddagger (T - T_0)]}{RT} + \frac{[\Delta S_{T_0}^\ddagger + \Delta C_p^\ddagger \ln(T/T_0)]}{R} \quad (eq\ 3)$$

Donde $\ln k$ es el logaritmo natural de la constante de velocidad de reacción, k_B es la constante de Boltzmann, h es la constante de Planck, T es la temperatura absoluta, T_0 es la temperatura de referencia, ΔH^\ddagger es la entalpía de activación de la reacción a la temperatura de referencia, ΔS^\ddagger la entropía de activación de la reacción a la temperatura de referencia y ΔC_p^\ddagger es la diferencia entre la capacidad calorífica del complejo enzima-sustrato en estado basal y en estado de transición [Hobbs, *et al.*, 2013].

2.2.3. Capacidad calorífica en proteínas

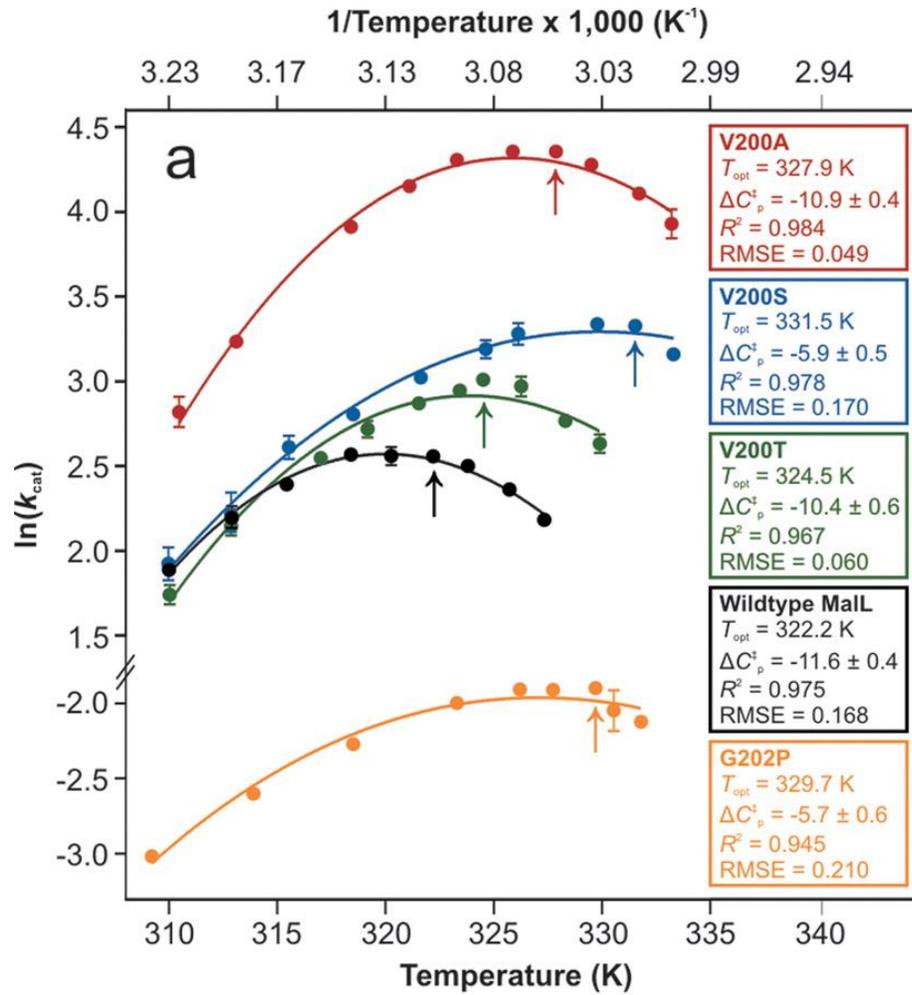
La capacidad calorífica es un parámetro termodinámico muy estudiado junto con otros parámetros como la entropía (S), la entalpía (H) y la energía libre de Gibbs (G). Este parámetro ha sido definido como el cambio en la entalpía o la energía necesaria, para generar un cambio en la temperatura del sistema [Ladenstein, 2008].

En moléculas pequeñas no se espera un cambio en capacidad calorífica importante de los reactantes durante una reacción; sin embargo, en macromoléculas como lo son las proteínas, este parámetro define el cambio en la energía interna del sistema y se relaciona con los modos vibracionales de la misma, los cuales sufren cambios durante la catálisis [Arcus *et al.*, 2016]. Las enzimas, a lo largo de la evolución, han logrado tener mayor afinidad por el estado de transición que por el sustrato, de manera que hay mayor entropía (un número mayor de estados vibracionales) en el complejo enzima-sustrato que en el complejo enzima-estado de transición, dando por resultado un valor de ΔC_p^\ddagger negativo [Hobbs, *et al.*, 2013].

2.2.4. Cambio en la capacidad calorífica (ΔC_p) y temperatura óptima (T_{opt})

Las curvas obtenidas mediante el ajuste a la ecuación de MMRT, se comportan conforme los valores experimentales, prediciendo la caída de la constante de velocidad a temperaturas mayores a la T_{opt} . Con este ajuste se obtienen valores de ΔC_p^\ddagger negativos [Hobbs, et al., 2013], debido a que la capacidad calorífica del complejo enzima-sustrato generalmente es mayor por su débil unión con el sustrato, comparado con la del complejo enzima-estado de transición que se une fuertemente [Arcus et al., 2016]. El cambio en la capacidad calorífica está estrechamente ligado a la temperatura óptima y para comprobarlo se han llevado a cabo una serie de experimentos en los que al modificar el ΔC_p^\ddagger , la temperatura óptima también sufre modificaciones. En la Figura 2-3 se puede observar esta relación, se utilizó como modelo de estudio la enzima MalL (α -glucosidasa), y una serie de variantes que muestran un cambio en la temperatura óptima que correlaciona con cambios en el ΔC_p^\ddagger . En la figura se indica la temperatura óptima con una flecha; las curvas representan el comportamiento enzimático con respecto a la temperatura de MalL y sus variantes (negra-silvestre, roja-V200A, azul-V200S, verde-V200T y amarillo-G202P).

Con ello se observó que dos variantes (V200S y G202P) muestran un cambio notorio en la T_{opt} , al igual que en el ΔC_p^\ddagger . Sin embargo, los parámetros cinéticos de cada variante, siguieron un comportamiento diferente, ya que, aunque en ambos casos mejoró la afinidad con respecto a la silvestre, la k_{cat} se vio afectada negativamente en la variante G202P, mientras que en la variante V200S la k_{cat} se vio mejorada. En un intento de explicar este comportamiento, se cristalizaron y analizaron por simulaciones de dinámica molecular, tanto la enzima silvestre como las dos variantes (Figura 2-4). Obteniendo que en el cambio de V200S, la proteína se estabiliza por la presencia de dos puentes de hidrógeno, lo que provoca una disminución en la dinámica de la enzima en el estado basal. Esto causa que la proteína se vuelva más rígida, y al no existir un cambio negativo en la k_{cat} indica que el aumento de ΔC_p^\ddagger se debe a la rigidización del estado basal de la enzima, sin algún impacto en el estado de transición. En cambio, en la mutante G202P se observa una dinámica muy similar a la de la enzima silvestre en el estado basal, por lo que la capacidad calorífica en el estado basal no presenta cambios, pero su k_{cat} se muestra comprometida indicando que la enzima está sufriendo alguna alteración en el estado de transición; por lo que los autores atribuyen que el aumento de ΔC_p^\ddagger se debe a que de alguna forma el complejo enzima-sustrato en estado de transición incrementó su flexibilidad, con un aumento en el ΔG^\ddagger de la reacción y por ello la disminución de la constante catalítica. [Hobbs et al, 2013].



b

Enzyme	K_M (μM)	k_{cat} (min^{-1})	k_{cat}/K_M ($10^3 \text{ min}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$)
Wildtype MALL	205 ± 19	29 ± 0.6	141 ± 14
V200A	1560 ± 161	125 ± 4	80 ± 10
V200S	105 ± 11	36 ± 0.8	343 ± 40
V200T	122 ± 12	36 ± 0.7	295 ± 32
G202P	92 ± 13	6 ± 0.2	65 ± 10

Figura 2-3. Efecto de la mutación en T_{opt} , ΔC_p^\ddagger , y parámetros Michaelis-Menten de la α -glucosidasa MALL

Tomada de Hobbs, et al., 2013. La imagen permanece en su idioma original.

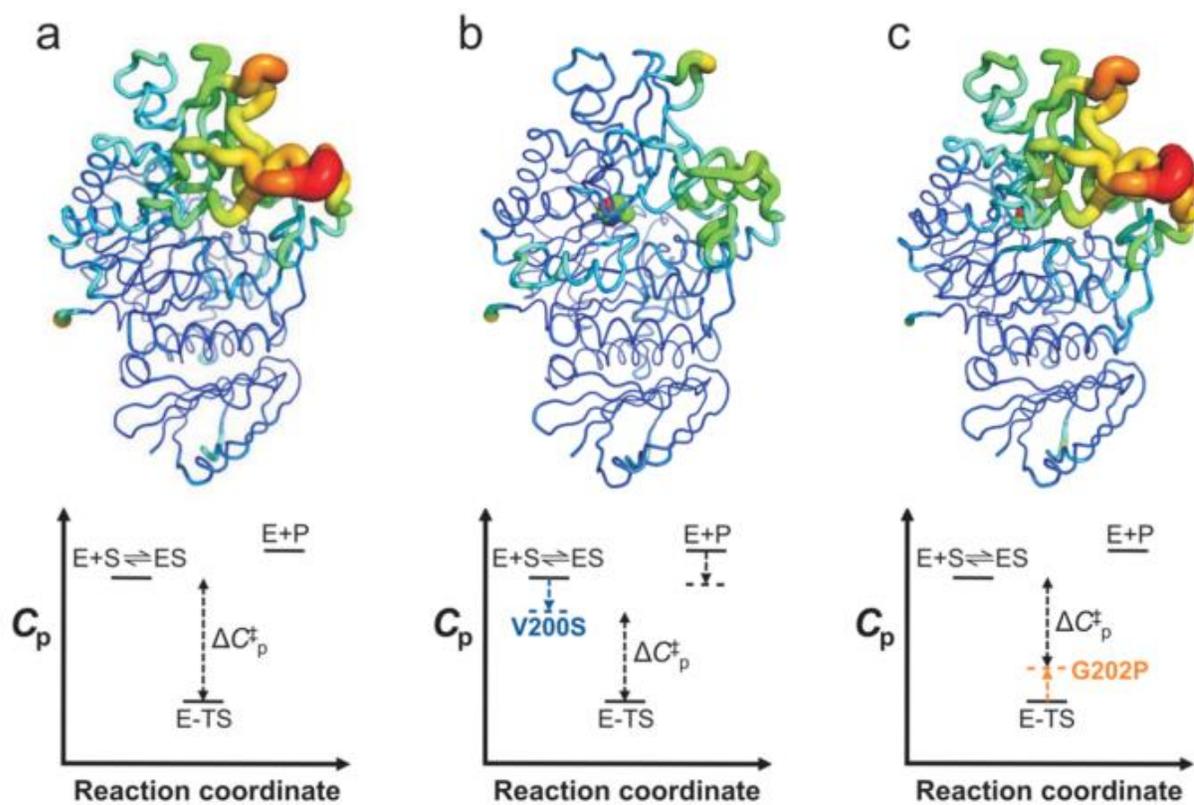


Figura 2-4. Representación de las simulaciones de dinámica molecular de MalL silvestre, V200S y G202P

Tomada de *Hobbs, et al., 2013*. La imagen permanece en el idioma original.

Con estos datos experimentales se logró mostrar dos formas de aumentar la T_{opt} de la catálisis enzimática con los consecuentes cambios en el ΔC_p^\ddagger . En uno de ellos lo que se afecta es la capacidad calorífica del estado basal, en cuyo caso, la catálisis enzimática no se ve disminuida, mientras que, en el otro, aumenta la capacidad calorífica en el estado de transición, con la consecuente disminución de k_{cat} . Esta correlación entre el ΔC_p^\ddagger y la T_{opt} explica por qué las enzimas psicrófilas requieren ser tan flexibles y las enzimas termófilas tan rígidas ante temperaturas extremas para llevar a cabo la actividad enzimática; pero más importante, nos indica que modificaciones en la capacidad calorífica de la enzima pueden tener una contribución importante en la catálisis.

2.2.5. Relación entre la masa y la actividad catalítica

En la célula siempre ocurren diversos procesos que requieren energía. La célula naturalmente siempre busca minimizar el gasto energético; sin embargo, la síntesis proteica es uno de los procesos energéticamente más caros, por lo que debe ser muy regulado y justificado. Con este razonamiento se esperaría que las proteínas fueran lo más pequeñas posibles, para disminuir el gasto de energía. Sin embargo, las enzimas tienen masa muy variable entre una y otra, existiendo proteínas pequeñas y otras muy grandes. ¿A qué se debe esta variación? Existen diversas explicaciones que intentan justificar que las enzimas sean muy grandes. Una de ellas es que requieren un cierto número de residuos para lograr la estructura correctamente plegada o incluso la conformación del sitio catalítico, en el que no solo se debe considerar a los residuos que llevan a cabo la catálisis, sino también a aquellos que permiten que estos residuos se orienten adecuadamente [Srere, 1984]. Otra posible explicación es que el gran tamaño de las proteínas proporciona medios para redirigir la energía térmica hacia el sitio activo y favorecer eventos de alta energía libre [Kell, 1982], es decir actúa como un canal de energía térmica hacia el sitio catalítico. Otros relacionan el tamaño con la estabilización del estado de transición [Britt, 1997].

Los autores de MMRT consideran que la masa está relacionada con el ΔC_p^\ddagger , ya que finalmente el ΔC_p^\ddagger involucra los modos vibracionales de la enzima, y mientras mayor sea el número de residuos de aminoácidos que la conforman, mayor número de modos vibracionales tendrá. Se puede visualizar como un reservorio energético mucho mayor, en el que no solo los modos vibracionales del sitio catalítico contribuyen a la estabilización del estado de transición, sino los de toda la enzima. Para comprobar este razonamiento, relacionaron la masa molecular de diversas enzimas con la relación de las constantes de reacción catalizada enzimáticamente y no catalizada (Figura 2-5). Observaron una correlación que indica que aquellas reacciones que tienen una mayor energía de activación, son catalizadas por enzimas más grandes y aquellas en las que su energía de activación es menor, la masa de la enzima es menor [Arcus et al., 2016]. Esta información sugiere que la masa del sistema es un parámetro sumamente importante para la catálisis enzimática.

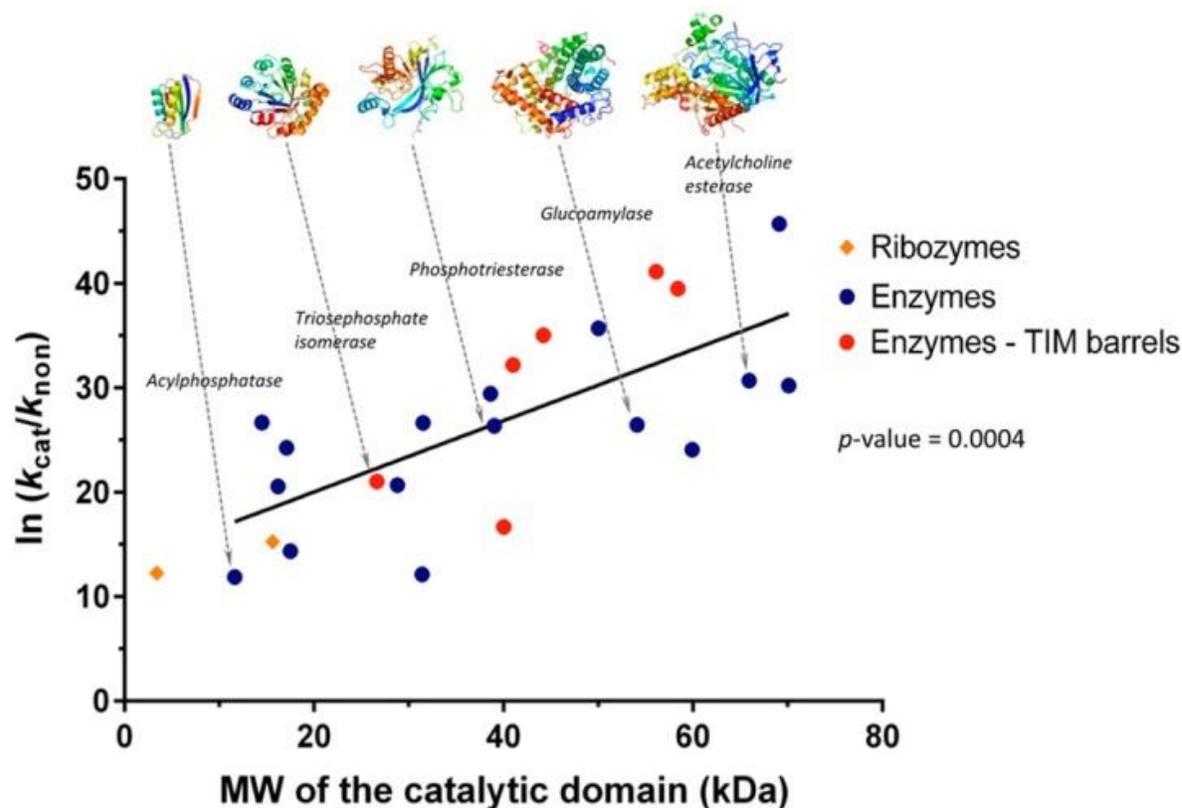


Figura 2-5. Relación entre la masa molecular de una enzima contra la velocidad de reacción

Tomada de Arcus, *et al.*, 2016. La imagen permanece en el idioma original.

2.2.6. Sustitución isotópica como herramienta para estudiar el comportamiento enzimático

La sustitución isotópica en proteínas ha sido ampliamente utilizada para explicar el comportamiento de las proteínas, desde el punto de vista estructural hasta el funcional [Bennet, 2012]. Al incorporar átomos pesados en una molécula, ésta disminuirá la frecuencia vibracional de todos los modos vibracionales sin afectar la estructura electrónica de la molécula [Jones *et al.*, 2018].

Puesto que una importante contribución al ΔC_p^\ddagger está relacionado con los modos vibracionales de la enzima, la sustitución isotópica parece ser una herramienta de gran utilidad. Por ello Jones y colaboradores han analizado la relación del efecto de la sustitución isotópica y el ΔC_p^\ddagger . Este grupo de trabajo genera glucosa con diversos niveles de sustitución de hidrógeno por deuterio (Figura 2-6 C), y la utilizan como sustrato para la enzima glucosa deshidrogenasa. Al analizar el comportamiento enzimático (Figura 2-6A) concluyen que el efecto cinético de la sustitución isotópica se ajusta a la

ecuación de la teoría de la velocidad macromolecular (eq. 3) y observan una relación entre el número de sustituciones y el ΔC_p^\ddagger , encontrando que a mayor número de sustituciones isotópicas el ΔC_p^\ddagger aumenta (Figura 2-6B). Se sabe que la sustitución isotópica causa una disminución en la frecuencia vibracional, sin embargo, no se ha logrado explicar que efecto tiene sobre los diferentes estados y como es que se logra aumentar el ΔC_p^\ddagger .

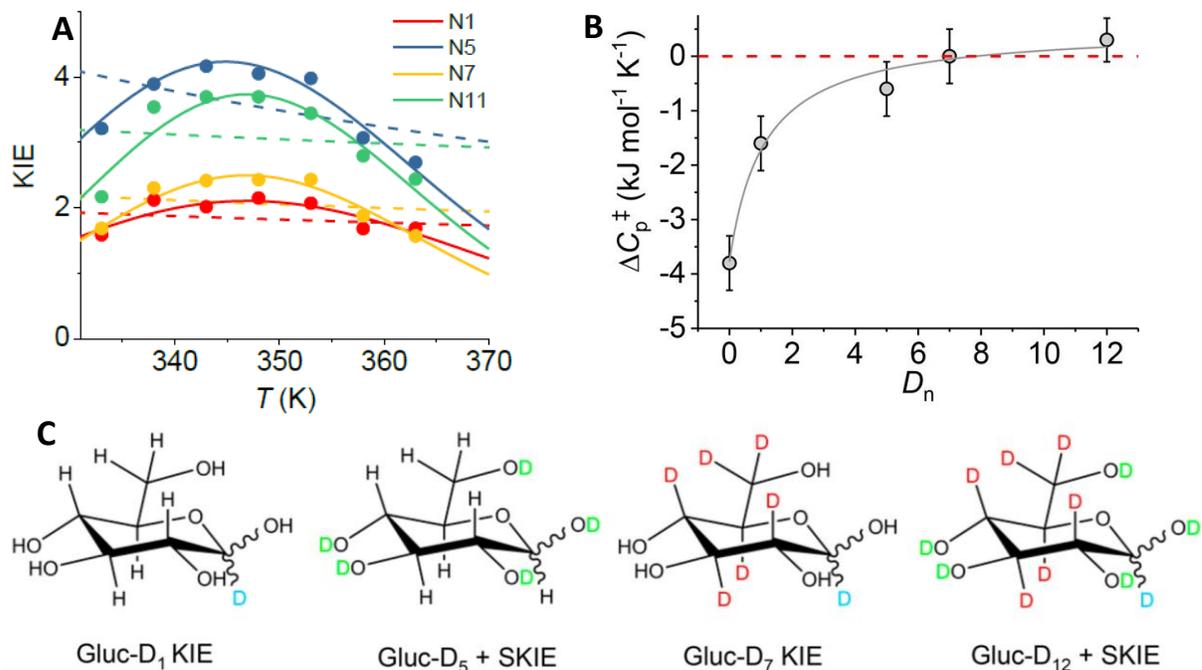


Figura 2-6. Efecto de la sustitución isotópica en ΔC_p^\ddagger

A) Comportamiento del efecto isotópico con respecto a la temperatura. Las líneas punteadas muestran el ajuste con la ecuación de Eyring, líneas continuas representan el ajuste con la ecuación de MMRT. B) Efecto del número de sustituciones isotópicas sobre el ΔC_p^\ddagger . C) Representación de las diversas sustituciones isotópicas en la glucosa utilizada como sustrato.

N1, N5, N7, N11: El número de sustituciones isotópicas en la glucosa (corresponden con Gluc-D₁, Gluc-D₅, Gluc-D₇ y Gluc-D₁₂ en la figura C). D_n: cantidad de deuterio en la molécula de glucosa. KIE: Efecto isotópico cinético. SKIE: Efecto isotópico cinético secundario (aquel que no está involucrado directamente con los átomos que participan durante la catálisis)

Tomada de Jones, *et al.*, 2018. La imagen permanece en el idioma original.

3. JUSTIFICACIÓN

Existen ejemplos en los que a través de mutaciones se ha logrado hacer cambios en el ΔC_p^\ddagger de reacciones catalizadas por enzimas. Sin embargo, el efecto de la modificación de los modos vibracionales de la enzima sobre la catálisis, no ha podido ser claramente elucidado, ya que existe la posibilidad de que en los experimentos con MalL se esté modificando el mecanismo de reacción y por ello exista un cambio en los parámetros catalíticos. El presente trabajo forma parte de un proyecto en el que se propone cambiar la frecuencia de los modos vibracionales de una enzima sin modificar el sitio catalítico, para evaluar el efecto del ΔC_p^\ddagger sobre la catálisis enzimática.

Para demostrar que el ΔC_p^\ddagger contribuye a la catálisis enzimática, es necesario contar con un modelo que permita evaluar su efecto sin modificar otros aspectos, como el mecanismo de acción o el microambiente que se genera en la región catalítica, ya que pudieran causar una interpretación equivocada. Por ello el uso de una enzima dimérica suena muy atractivo; en una misma proteína se tiene una subunidad a la que se le puede modificar la frecuencia de modos vibracionales mediante incorporación de isótopos pesados y se tiene otra subunidad que actúa de reportera de la actividad enzimática. Sin embargo, en la bibliografía no se tiene suficiente información para proponer una proteína que asegure su funcionamiento. Por ello este estudio pretende buscar una enzima que cubra la mayoría de los requisitos antes descritos y una vez determinado con que proteína se trabajará, asegurar que el perfil de desplegamiento y replegamiento, de dicha enzima sea el adecuado. También es necesario evaluar el comportamiento de la actividad enzimática con respecto a la temperatura y asegurar que el proceso de desplegamiento térmico no se encuentre en el intervalo de temperatura empleado para la caracterización cinética. Todo esto con el fin de proponer una enzima homodimérica que funcione como modelo para evaluar el efecto de la capacidad calorífica en la catálisis enzimática.

4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

4.1. Hipótesis

A partir de la búsqueda bibliográfica, se seleccionará una enzima que presente un comportamiento cinético, cuya temperatura óptima se encuentre en un intervalo lejano a la temperatura de desnaturalización de la enzima y un perfil de desplegamiento adecuado para proponerla como modelo enzimático que permita estudiar el efecto del ΔC_p^\ddagger en la catálisis enzimática.

4.2. Objetivo general

Proponer una enzima homodimérica como modelo de estudio para evaluar el efecto de la capacidad calorífica sobre la catálisis enzimática, mediante la caracterización de su desplegamiento-replegamiento y su comportamiento cinético con respecto a la temperatura.

4.3. Objetivos específicos

- Proponer una enzima homodimérica para caracterizar su desplegamiento y su comportamiento cinético con respecto a la temperatura.
- Establecer las condiciones adecuadas de expresión y purificación del dímero.
- Caracterizar las condiciones de desplegamiento y replegamiento de la proteína.
- Analizar el efecto de la temperatura sobre los parámetros cinéticos de la enzima.
- Obtener la enzima de interés fusionada a la proteína de unión a maltosa (MPB)
- Obtener la variante catalíticamente inactiva con una etiqueta de 6 histidinas.

5. MATERIALES

5.1. Reactivos biológicos y químicos

5.1.1. Reactivos químicos y bioquímicos

Becton Dickinson (BD): agar bacteriológico; casaminoácidos; extracto de levadura; triptona. *Bio-Rad*: acrilamida; agarosa; azul de bromofenol; azul de xilencianol. *GE Healthcare*; Ni Sepharose® 6Fast Flow. *J. T. Baker*: acetonitrilo; ácido etilendiamino-tetra-acético (EDTA); cloruro de amonio (NH_4Cl) cloruro de sodio (NaCl); dextrosa; dodecil sulfato de sodio (SDS) fosfato de potasio dibásico (K_2HPO_4); fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4); fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4); fosfato de sodio monobásico tetrahidratado ($\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$); glicerol; sacarosa; sulfato de magnesio (MgSO_4). *MACRON*: hidróxido de sodio. *Sigma*: 2-mercaptoetanol; 3-bromo-1,2-propanodiol; ampicilina; arabinosa; azul brillante de Coomassie; cloruro de calcio (CaCl_2); cloruro de cobalto hexahidratado ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$); cloruro de hierro hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$); ditioneitol (DTT); epibromohidrina; epinefrina; fluoruro de Sodio (NaF); imidazol; kanamicina; L-arginina; membranas de celulosa para diálisis; *N, N, N', N'*-tetra-metil-etilendiamina (TEMED); peryodato de sodio (NaIO_4); sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$); sulfato de níquel hexahidratado; sulfato de zinc heptahidratado ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$); tris (tris[hidroximetil]aminometano); urea. *USD*: persulfato de amonio.

5.1.2. Enzimas y otros reactivos biológicos

Maestrogen: marcador de peso molecular para DNA (AccuRuler 100bp DNA Ladder y AccuRuler 1kb DNA Ladder); marcador de peso molecular para proteínas (AccuRuler RGB Prestained Protein Ladder). *New England Biolabs*: endonucleasas (EcoRI, NcoI, NheI, NotI, SacI y XhoI) y sus soluciones amortiguadoras 10X. *Thermo Fisher Scientific*: deoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTP's); T4 DNA ligasa y su solución amortiguadora.

5.1.3. Estuches comerciales

Los productos de PCR se purificaron usando el *High Pure PCR Product Purification Kit*; y el ADN plasmídico se purificó con el *High Pure Plasmid Isolation Kit*; ambos de Roche

5.2. Células bacterianas y medios de cultivo

Las cepas de *E. coli* utilizadas en el estudio se enlistan en la Tabla 5-1. La cepa Top10, a pesar de ser un sistema empleado para mantenimiento y clonación, se utilizó como sistema de expresión de la proteína. Esto se debe a que no utiliza arabinosa como fuente de carbono, que es el inductor bajo el cual está el sistema de expresión y además se ha reportado una buena producción de proteína en esta cepa. La cepa MC1061 se utilizó como hospedera en protocolos de clonación molecular.

Las bacterias se cultivaron en medio LB líquido (1% de triptona; 0.5% de extracto de levadura; 1% de NaCl), o sólido (LB más 1.7% de agar bacteriológico), suplementado con el antibiótico necesario de acuerdo con el plásmido para no perderlo. Para la expresión de la proteína, las bacterias se cultivaron según el diseño experimental, en medio enriquecido Terrific Broth (1.2% de triptona; 2.4% de extracto de levadura; 4 ml/L de glicerol; solución amortiguadora de fosfatos de potasio pH 7.2: 17 mM KH₂PO₄ y 72 mM K₂HPO₄), en medio mínimo líquido (21 mM Na₂HPO₄; 11 mM KH₂PO₄; 9.4 mM NH₄Cl; 4.2 mM NaCl; 1 mM MgSO₄; 0.2% glucosa; 0.1% Casaminoácidos) o en medio mínimo líquido suplementado con trazas de minerales (8.6 μM NaCl; 62 μM FeCl₃·6H₂O; 0.63 μM ZnSO₄·7H₂O; 0.64 μM CuSO₄·5H₂O; 0.76 μM CoCl₂·6H₂O; 54 μM Na₂EDTA·2H₂O) utilizando ampicilina o kanamicina para la selección de aquellas bacterias que contenían el plásmido. El medio 2XYT (1.6% de triptona; 1% de extracto de levadura; 0.5% de cloruro de sodio) se utilizó como medio de recuperación bacteriana.

Cepa	Genotipo
TOP10	<i>araD139 Del(araA-leu)7697 Del(lac)X74 galK16 galE15(GalS)</i> <i>lambda- e14- mcrA0 relA1 rpsL150(strR) spoT1 mcrB1 hsdR2</i>
MC1061	<i>str. K-12 F- λ- Δ(ara-leu)7697 [araD139]B/r Δ(codB-lacI)3 galK16</i> <i>galE15 e14- mcrA0 relA1 rpsL150(StrR) spoT1 mcrB1 hsdR2(r-m+)</i>

Tabla 5-1. Genotipos de las cepas de *E. coli* utilizadas en el estudio

5.3. Plásmidos

El plásmido recombinante pDPM73-PaCIF-6His (Figura 5-1), derivado del plásmido pMQ70, contiene el gen PA14_26090 de *P. aeruginosa* de la cepa PA14 [Bahl et al., 2010b]. Este gen codifica para el factor de virulencia CIF (epóxido hidrolasa) de la bacteria. La secuencia codificante se encuentra en fase con una etiqueta molecular de 6 histidinas en el extremo C-terminal y se expresa bajo el control de un promotor inducible por arabinosa. Este plásmido tiene un gen codificante a β-lactamasa, lo que confiere resistencia al antibiótico ampicilina.

El plásmido comercial pET-28a (+) (Figura 5-2) se utilizó como receptor del gen codificante para epóxido hidrolasa de *P. aeruginosa* fusionándolo al gen codificante para una proteína de unión a maltosa (MBP, por sus siglas en inglés: *maltose binding protein*) en el extremo carboxilo terminal, esto con la finalidad de tener un método de purificación por afinidad distinto al anterior, con su respectivo sitio de reconocimiento a la proteasa TEV para posteriormente eliminar a MPB. Este plásmido contiene el gen *aph (3')-Ia* que codifica para aminoglucósido fosfotransferasa, enzima que confiere resistencia a kanamicina.

El plásmido comercial pET MBP mOrange LIC (Figura 5-3) se utilizó como donador del gen de proteína de unión a maltosa. Este plásmido contiene diversas etiquetas moleculares de las cuales solo nos interesa MBP. Contiene el gen *aph (3')-Ia* que codifica para aminoglucósido fosfotransferasa, enzima que confiere resistencia a kanamicina.

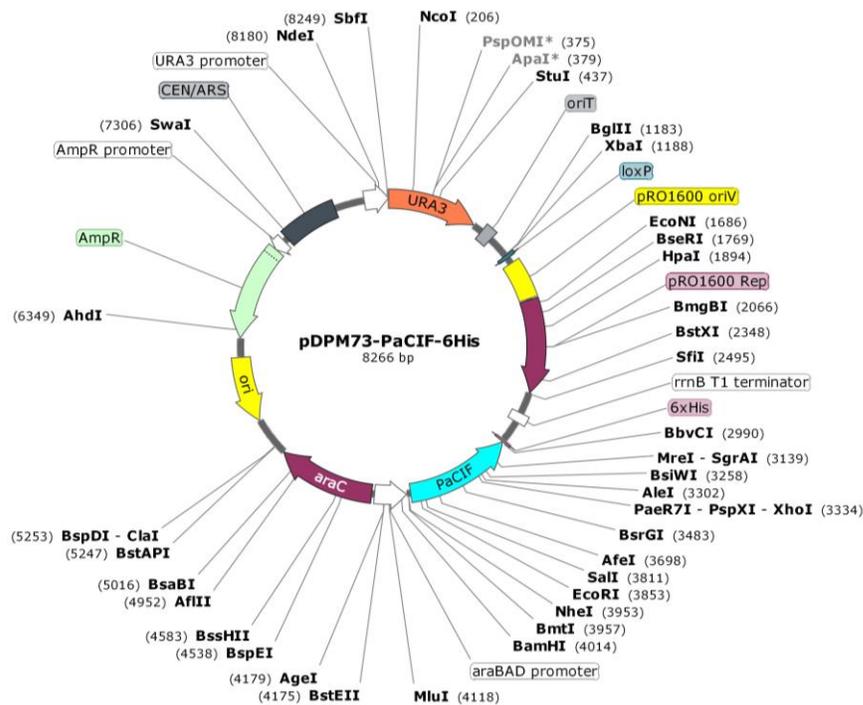


Figura 5-1. Representación esquemática del plásmido pDPM73-PaCif-6His

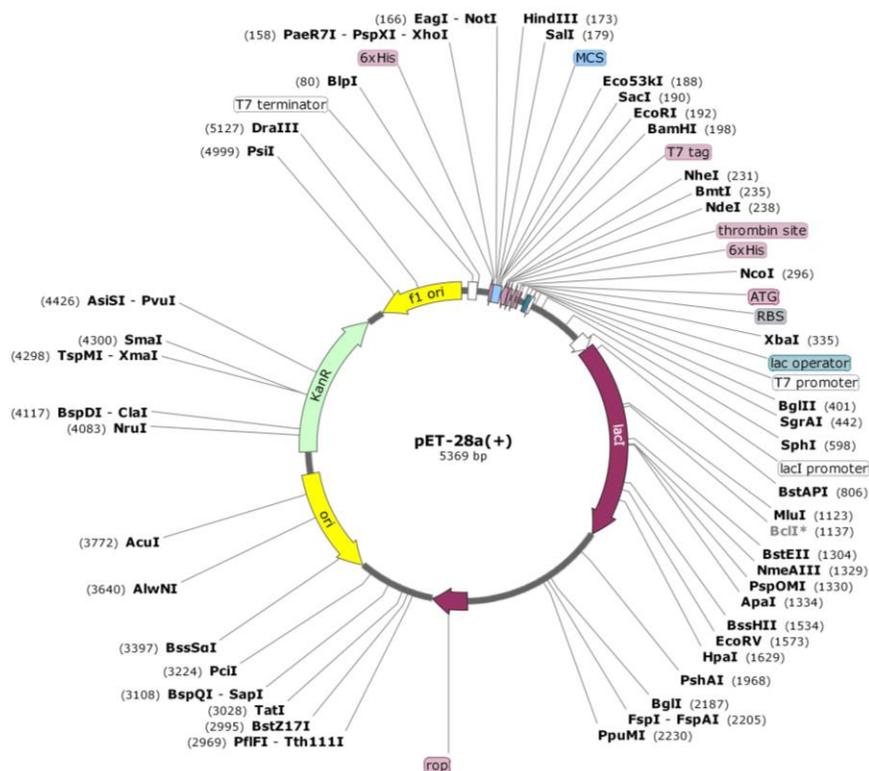


Figura 5-2. Representación esquemática del plásmido pET-28a(+)

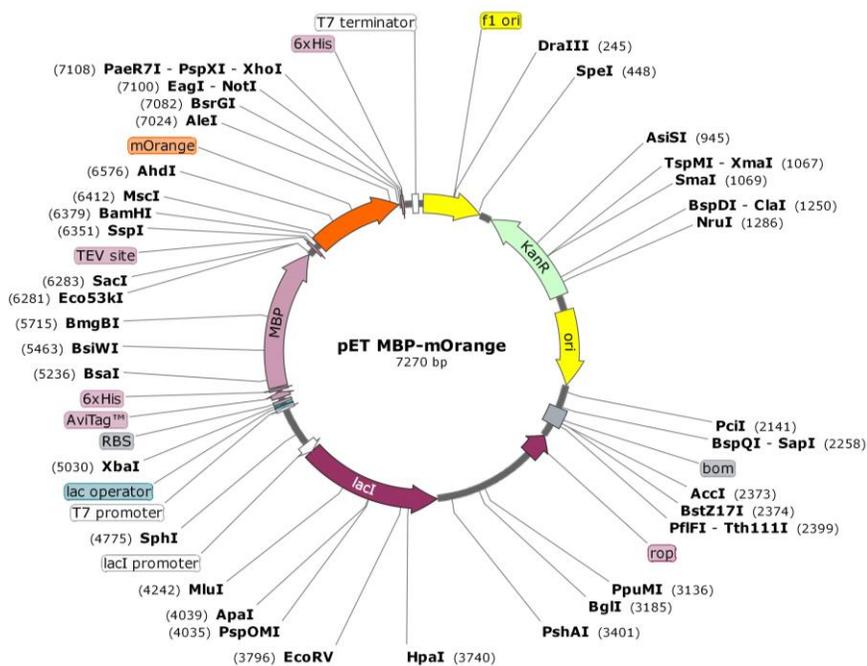


Figura 5-3. Representación esquemática del plásmido pET MBP mOrange LIC

6. MÉTODOS

6.1. Búsqueda informática

Para la búsqueda del modelo de estudio adecuado, las herramientas utilizadas fueron las bases de datos de PDB (<https://www.rcsb.org/>), UniProt (<https://www.uniprot.org/>), NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) en las cuales la búsqueda se centró en una enzima homodimérica, con las siguientes características: no presente modulación alostérica, no requiera cofactores, con sitios catalíticos independientes uno del otro, que la actividad enzimática no esté limitada por la difusión, que sea un dímero obligado con un plegamiento reversible, no requiera modificaciones postraduccionales complejas y que los productos de reacción no sean tóxicos para el humano o el medio ambiente. También se utilizó PyMOL para visualizar y analizar las estructuras tridimensionales, así como las características importantes de las proteínas de interés.

6.2. Preparación de células electrocompetentes

La fracción celular de una suspensión bacteriana (1 mL a 0.4-0.6UDO₆₀₀) se separó mediante centrifugación (13,000 x g; 2 min). Enseguida, la pastilla celular se lavó en tres ocasiones (mediante resuspensión, manteniendo todas las soluciones en hielo): primeramente, en 0.5 mL de agua destilada estéril, posteriormente, en 0.5 mL de glicerol al 10% estéril, este paso por duplicado. Después de cada resuspensión, la fracción celular se mantuvo en hielo durante 5 min y se separó mediante centrifugación (2,000 x g; 5 min; 10 °C). Finalmente, la pastilla se resuspendió en 0.05 mL de glicerol al 10% estéril. [*New England Biolabs, 2015*].

6.3. Preparación de células quimiocompetentes

La fracción celular de una suspensión bacteriana (1 mL a 0.4-0.6UDO₆₀₀) se separó mediante centrifugación (13,000 x g; 2 min). Enseguida, la pastilla celular se lavó en dos ocasiones (mediante resuspensión, manteniendo todas las soluciones en hielo): primeramente, en 0.5 mL de agua destilada estéril, posteriormente, en 0.5 mL de CaCl₂ a 100 mM estéril. Después de cada resuspensión, la fracción celular se mantuvo en hielo durante 5 min y se separó mediante centrifugación (2,000 x g; 5 min; 10

°C). Finalmente, la pastilla se resuspendió en 0.05 mL de CaCl₂ a 100 mM estéril y se mantuvo durante 5 min en hielo [Sambrook et al., 2001].

6.4. Transformación y selección bacteriana

Transformación por electroporación: 10 pg - 25 ng de DNA se transfirieron a 50 µl de células electrocompetentes (sección 6.2.) la mezcla se incubó por 30-60 segundos en hielo. Se transfirió a una celda para electroporación y se dio un pulso eléctrico a tiempo constante de 4-5 milisegundos de 25 µF, 2.5 kV y 200 ohm de resistencia con ayuda de un electroporador. Posteriormente se transfirió a 1 ml de medio 2XYT y se incubó por una hora a 37 °C. La suspensión se cultivó en medio LB sólido suplementado con el correspondiente antibiótico. Se incubó a 37 °C por 12-16 horas. [New England Biolabs, 2015].

Transformación por choque térmico: 10pg - 25ng de DNA se añadieron a 50 µl de células quimiocompetentes (sección 6.3.), se incubaron 30 minutos en hielo, seguido de 90 segundos a 42 °C, finalmente 5 minutos en hielo. Posteriormente se transfirió a 1 ml de medio 2XYT y se incubó por una hora a 37°C. La suspensión se cultivó en medio LB sólido suplementado con el correspondiente antibiótico. Se incubó a 37 °C por 12-16 horas [Sambrook et al., 2001].

6.5. Electroforesis en gel de agarosa

Las muestras analíticas se prepararon mezclando 5 volúmenes de solución de ADN con 1 volumen de solución 6X para cargado (0.25% de azul de bromofenol; 0.25% de azul de xilencianol; 30% de glicerol). Enseguida, una alícuota (10 µL) de cada muestra se cargó en un gel al 1% de agarosa, suplementado con bromuro de etidio. La separación electroforética de fragmentos de ADN (en base a su talla molecular) se realizó a 100 V (20-40 min). Una vez concluida, el gel se visualizó usando un fotodocumentador *Gel DocTM EZ Imager* (Bio-Rad).

6.6. Expresión de proteínas

La valoración de expresión proteica se llevó a cabo utilizando un subcultivo de células bacterianas portadoras del plásmido de interés. Inicialmente, se preparó un cultivo joven mediante incubación en medio LB, suplementado con el antibiótico apropiado. Posteriormente, se preparó un subcultivo en el medio utilizado para la expresión (Terrific Broth o medio mínimo) y se incubó a 37 °C hasta que alcanzó una DO₆₀₀ de 0.5 (fase de pre-inducción), con agitación constante (200 rpm). La inducción de la

expresión se logró mediante la adición de arabinosa 0.1%. La expresión se favoreció mediante la incubación a 30 °C durante 48-72 horas (fase de sobreexpresión), con agitación constante (200 rpm) [Bahl et al., 2010b]. Posteriormente se separó el contenido secretado de las células mediante centrifugación (12,000 x g; 30 min; 4 °C).

6.7. Extracción de proteínas periplásmicas

La pastilla se resuspendió en una solución hipertónica (30 mM Tris; 20% w/v sacarosa; 1mM EDTA, pH 8.0) en una relación 1:40 (p. ej., 2.5 mL de medio para una pastilla proveniente de 100 mL de cultivo). La suspensión celular se incubó en hielo por 30 minutos, posteriormente se separó la fracción soluble por centrifugación (12,000 x g; 15 minutos; 4 °C). El sobrenadante se transfirió a un tubo limpio rotulado como fracción periplásmica. El precipitado se resuspendió en una solución hipotónica (5 mM MgSO₄) en una relación 1:40. La suspensión celular se mantuvo en hielo por 30 minutos, posteriormente se separó la fracción soluble por centrifugación (12,000 x g; 15 minutos; 4 °C). El sobrenadante se transfirió al tubo anterior que contenía la fracción hipertónica.

6.8. Purificación mediante afinidad a metales

El sobrenadante obtenido en las secciones 6.6 o 6.7 se utilizó para separar la proteína de interés por una columna de agarosa derivatizada con ácido nitrilo acético que actúa como quelante de los iones de níquel. Inicialmente el sobrenadante se diluyó con un volumen de solución amortiguadora de lavado (BW: 500 mM NaCl; 20 mM NaH₂PO₄ pH 7.4; 10mM imidazol pH 8.0). Esta dilución se cargó a la columna, posteriormente la columna se lavó con la solución amortiguadora BW. La elución de la proteína se logró con la adición de una solución amortiguadora de elución (BE: 500 mM NaCl; 20 mM NaH₂PO₄ pH 7.4; 250-500 mM imidazol pH 8.0) [Cayir et al., 2014].

6.9. Separación de proteínas mediante SDS-PAGE

Las muestras analíticas se prepararon mezclando la solución de proteínas con solución amortiguadora para cargado en condiciones reductoras (concentración final: 10% de glicerol; 2% de SDS; 5% de 2-mercaptoetanol; 0.002% de azul de bromofenol; 62.5 mM de Tris-HCl, pH 6.8). En seguida, las proteínas se desnaturalizaron por temperatura durante 10 min a 95-100 °C. Una alícuota de cada muestra se cargó en un gel de SDS-poliacrilamida al 12% [Laemmli, 1970]. La separación de

proteínas (en base a su masa molecular) se llevó a cabo en dos etapas: durante su paso por el gel concentrador y durante su paso por el gel separador. Una vez concluida la separación electroforética, el gel se tiñó con azul brillante de Coomassie.

6.10. Separación de proteínas en condiciones nativas

Las muestras analíticas se prepararon mezclando la solución de proteínas con solución amortiguadora para cargado en condiciones nativas (concentración final: 10% de glicerol; 0.002% de azul de bromofenol; 62.5 mM de Tris-HCl, pH 6.8). Una alícuota de cada muestra se cargó en un gel de poliacrilamida (sin SDS) al 10% [Laemmli, 1970]. La separación de proteínas (en base a su masa molecular) se llevó a cabo en dos etapas: durante su paso por el gel concentrador y durante su paso por el gel separador. Una vez concluida la separación electroforética, el gel se tiñó con azul brillante de Coomassie.

6.11. Cuantificación de proteínas

Bradford: En pocillos de una microplaca, se prepararon diluciones de concentración conocida de BSA (0, 1, 2, 3, 4, y 5 $\mu\text{g/mL}$), a partir de una solución a 5 $\mu\text{g/mL}$, en un volumen final de 0.05 mL (usando agua como diluyente). Paralelamente, se prepararon diluciones (por duplicado) de cada muestra de proteína, ubicadas en el rango de 0–5 $\mu\text{g/mL}$ (p. ej., 1:25, 1:50, 1:100, 1:200). Posteriormente, a cada pocillo, se agregaron 0.1 mL del reactivo de Bradford, se mezcló perfectamente, y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. Inmediatamente, las absorbancias a 450 y 595 nm (A450 y A595) de cada pocillo fueron registradas usando un espectrofotómetro de microplaca. La curva estándar de BSA se elaboró graficando la concentración (en $\mu\text{g/mL}$) de cada dilución contra la relación A595/A450 correspondiente, obteniéndose valores típicos de coeficiente de correlación (R^2) mayores de 0.98. La concentración de proteínas se determinó interpolando el promedio de la relación A595/A450 de cada muestra analizada y multiplicando por el factor de dilución [Ernst & Zor, 2010].

Coefficiente de extinción molar: A partir de 1 μL de muestra, se midió la absorbancia a 280 nm por duplicado. La concentración de proteína se obtuvo a través del coeficiente de extinción molar teórico $\epsilon = 46,995 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ obtenido de la secuencia de aminoácidos utilizando ProtParam tools del servidor ExPASy Proteomics [Gasteiger et al., 2005].

6.12. Diálisis de la proteína

Después de su purificación la proteína se dializó de acuerdo con los requerimientos de cada ensayo, en todos los casos la diálisis se realizó a través de membranas de celulosa con un corte de masa molecular de 14 kDa, con agitación constante y a 4 °C.

- A) Cromatografía de exclusión molecular y ensayos de actividad enzimática: la proteína se dializó en dos rondas, la primera ronda durante 4 horas contra una solución 500 mM NaCl; 20 mM fosfato de sodio; 1 mM EDTA, pH 7.4; la segunda ronda durante toda la noche contra una solución 500 mM NaCl; 20 mM fosfato de sodio, pH 7.4.
- B) Ensayos de desnaturalización térmica: la proteína se dializó en cuatro rondas, las primeras dos se llevaron a cabo contra una solución 500 mM NaF; 20 mM fosfato de sodio; 1 mM EDTA, pH 7.4 suplementado con 35 mg/mL de DTT, cada ronda con una duración de 4 horas. Las últimas rondas se llevaron a cabo contra una solución 500 mM NaF; 20 mM fosfato de sodio; 1 mM EDTA, pH 7.4 suplementado con 70 μ L/L de β -mercaptoetanol, la tercera ronda con una duración de 4 horas y la última durante toda la noche.
- C) Ensayos de desnaturalización por agentes químicos: tanto para los ensayos de dicroísmo circular como de fluorescencia la proteína se dializó en cuatro rondas, las primeras dos se llevaron a cabo contra una solución 500 mM NaCl 20 mM fosfato de sodio; 1 mM EDTA, pH 7.4 suplementado con 35 mg/mL de DTT, cada ronda con una duración de 4 horas. Las últimas rondas se llevaron a cabo contra una solución 500 mM NaCl; 20 mM fosfato de sodio; 1 mM EDTA, pH 7.4 suplementado con 70 μ L/L de β -mercaptoetanol, la tercera ronda con una duración de 4 horas y la última durante toda la noche.

6.13. Cromatografía de exclusión molecular

La columna utilizada para cromatografía de exclusión molecular fue la Superose® 12 10/300 GL. Se utilizó un flujo constante de 0.3 mL/min de una fase móvil (500 mM NaCl; 20 mM fosfato de sodio pH 7.4). Se inyectaron 50 μ L de proteína previamente dializada (sección 5.5.11.A) a una concentración de 1.4 mg/mL. Se utilizaron proteínas con peso molecular conocido para realizar la curva estándar, estas proteínas fueron: albúmina de suero bovino (BSA), proteasa sumo (CHT), 3-dehidroquinato deshidratasa (DHQ) y β -lactoglobulina (BLG). La curva estándar se elaboró graficando el volumen de elución contra el logaritmo del peso molecular. El peso molecular se obtuvo por la interpolación del promedio del volumen de elución de la muestra analizada.

6.14. Análisis de la estructura secundaria

Los ensayos para determinar estructura secundaria se realizaron con ayuda de espectros de dicroísmo circular, el equipo utilizado fue un espectropolarímetro JASCO J-710 equipado con un controlador de temperatura. Las condiciones experimentales variaron según las necesidades del ensayo. En todos los casos, se analizó la estructura inicial de la proteína mediante un análisis de elipticidad molar en un intervalo de longitud de onda de 260-190 nm a 25 °C.

Para ensayos de desnaturalización térmica se utilizaron 0.3 mg/mL de proteína *PaCIF* previamente dializada (sección 6.12.B). El intervalo de temperatura que se utilizó fue de 25 °C hasta 75 °C, con un incremento de un grado por minuto. Se analizó la elipticidad molar a 222 nm. Para obtener la T_m se realizó un ajuste sigmoideo de Boltzmann.

Para ensayos de desnaturalización por agentes químicos se realizó una curva de desnaturalización con urea (0-9 M) donde se analizaron 36 puntos intermedios con 0.3 mg/mL de proteína *PaCIF* previamente dializada (Sección 6.12.C). Se incubó por 24 horas a 25 °C para llegar al equilibrio. Las curvas de desnaturalización con cloruro de guanidinio (0-6 M) se obtuvieron mediante el análisis de 36 puntos intermedios con 0.1 mg/mL y 0.3 mg/mL de proteína previamente dializada (Sección 6.12.C). Se incubó por 4 horas a 25 °C para llegar al equilibrio. Para cada muestra se tomó un espectro completo (260-190 nm). Los datos fueron ajustados a una línea basal y se tomó el valor de la señal a 222 nm para análisis posteriores.

6.15. Análisis de la estructura tridimensional

Para determinar la estructura tridimensional se analizó la fluorescencia intrínseca de triptófanos, el equipo utilizado fue un espectrómetro de fluorescencia PerkinElmer LS550. Las curvas de desnaturalización con cloruro de guanidinio (0 - 6 M) se obtuvieron mediante el análisis de 36 puntos intermedios con 0.05 mg/mL y 0.1 mg/mL de proteína previamente dializada (Sección 6.12.C). Se incubó por 4 horas a 25 °C para llegar al equilibrio. Las muestras fueron excitadas a 295 nm y se analizó la emisión de fluorescencia desde 300 nm hasta 500 nm. Se analizó la intensidad de fluorescencia de cloruro de guanidino a diversas concentraciones, esto para hacer una corrección a los datos experimentales. Una vez eliminada la contribución a la intensidad de fluorescencia del agente desnaturalizante, se calcularon los centros de masa espectral (CME) con la siguiente ecuación:

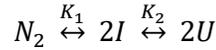
$$CME = \frac{\sum \lambda I_{\lambda}}{\sum I_{\lambda}}$$

Donde I_λ es la intensidad de fluorescencia a las diferentes longitudes de onda (λ). El valor calculado (CME) se utilizó en análisis posteriores.

6.16. Ajuste de datos a modelos matemáticos

El ajuste de datos de desplegamiento se llevó a cabo con ayuda de Savuka, un software que cuenta con un paquete global de análisis de datos, entre ellos diferentes funciones que explican el desplegamiento de proteínas diméricas. Los datos experimentales (θ_{222nm} y CME) se ajustaron a los siguientes modelos:

Modelo de tres estados con intermediario monomérico



Este modelo describe el comportamiento de desplegamiento de un dímero que presenta un intermediario monomérico. Donde N_2 representa el dímero en su estado nativo, $2I$ el intermediario monomérico y U el monómero en estado desplegado. Las ecuaciones para calcular los valores teóricos son las siguientes [Walters et al., 2009].

$$K_1 = e^{-\frac{\Delta G_{n-i} - (A_{n-i} [D])}{RT}} \quad K_2 = e^{-\frac{\Delta G_{i-u} - (A_{i-u} [D])}{RT}}$$

$$f_{N_2} = 1 - f_I - f_U$$

$$f_I = \frac{-(K_1 + K_1 K_2) + \sqrt{(K_1 + K_1 K_2)^2 + 8K_1 P_T}}{4P_T}$$

$$f_U = K_2 f_I$$

$$Y = Y_{N_2} f_{N_2} + Y_I f_I + Y_U f_U$$

Donde K_1 y K_2 representan las constantes de equilibrio entre los diferentes estados. ΔG_{n-i} y ΔG_{i-u} energía libre de Gibbs entre el estado nativo-intermediario e intermediario-desplegado respectivamente. A_{n-i} y A_{i-u} la dependencia de la energía libre de Gibbs de la concentración de agente desnaturante. $[D]$ es la concentración de desnaturante. f_{N_2} , f_I y f_U corresponden a las fracciones de proteína nativa, intermediario y desnaturada respectivamente. P es la concentración de proteína. Y_{N_2} , Y_I y Y_U son los valores teóricos que corresponden a proteína nativa, intermediario y desnaturada respectivamente.

Con ayuda de Savuka se obtuvieron los parámetros termodinámicos ΔG_{n-i} , ΔG_{i-u} , A_{n-i} y A_{i-u} , estos se utilizaron para obtener K1 y K2, los cuales permitieron calcular los valores teóricos de las diferentes fracciones (nativa, intermediario y desnaturalizada). Para obtener el valor correspondiente a Y_1 se calculó el rango de señal y se multiplicó por el factor Z. Este factor es un valor normalizado que representa la fracción de proteína desplegada cuando el intermediario aparece y se determina con la siguiente ecuación.

$$Z = \frac{Y_{I_{exp}} - Y_{N_2_{exp}}}{Y_{U_{exp}} - Y_{N_2_{exp}}}$$

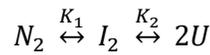
En donde $Y_{N_2_{exp}}$, $Y_{I_{exp}}$ y $Y_{U_{exp}}$ son los valores experimentales que corresponden a proteína nativa, intermediario y desnaturalizada respectivamente.

Para determinar las C_m (concentración media de cloruro de guanidinio) de cada transición se utilizaron las ecuaciones descritas abajo [Montecinos-Franjola et al., 2012]. Donde se sigue la nomenclatura descrita anteriormente.

$$C_{m_{n-i}} = \frac{\Delta G_{n-i} + RT \ln P}{A_{n-i}}$$

$$C_{m_{i-u}} = \frac{\Delta G_{i-u}}{A_{i-u}}$$

Modelo de tres estados con intermediario dimérico



Este modelo describe el comportamiento de desplegamiento de un dímero que presenta un intermediario dimérico. Donde N_2 representa el dímero en su estado nativo, I_2 el intermediario dimérico y U el monómero en estado desplegado. Las ecuaciones para calcular los valores teóricos son las siguientes [Walters et al., 2009].

$$K_1 = e^{-\frac{\Delta G_{n-i} - (A_{n-i} [D])}{RT}} \quad K_2 = e^{-\frac{\Delta G_{i-n} - (A_{i-n} [D])}{RT}}$$

$$f_{N_2} = 1 - f_{I_2} - f_U$$

$$f_{I_2} = \frac{2f_U^2 P_T}{K_2}$$

$$f_U = \frac{-K_1 K_2 + \sqrt{(K_1 K_2)^2 + 8P_T(K_1 K_2 + K_1^2 K_2)}}{4P_T(1 + K_1)}$$

$$Y = Y_{N_2} f_{N_2} + Y_{I_2} f_{I_2} + Y_U f_U$$

Donde K_1 y K_2 representan las constantes de equilibrio entre los diferentes estados. ΔG_{n-i} y ΔG_{i-u} energía libre de Gibbs entre el estado nativo-intermediario e intermediario-desplegado respectivamente. A_{n-i} y A_{i-u} la dependencia de la energía libre de Gibbs de la concentración de agente desnaturizante. $[D]$ es la concentración de desnaturizante. f_{N_2} , f_{I_2} y f_U corresponden a las fracciones de proteína nativa, intermediario y desnaturizada respectivamente. P es la concentración de proteína. Y_{N_2} , Y_{I_2} y Y_U son los valores teóricos que corresponden a proteína nativa, intermediario y desnaturizada respectivamente. Con ayuda de Savuka se obtuvieron los parámetros termodinámicos ΔG_{n-i} , ΔG_{i-u} , A_{n-i} y A_{i-u} , estos se utilizaron para obtener K_1 y K_2 , los cuales permitieron calcular los valores teóricos de las diferentes fracciones (nativa, intermediario y desnaturizada). Para obtener el valor correspondiente a Y_{I_2} se calculó el rango de señal y se multiplicó por el factor Z . Este factor es un valor normalizado que representa la fracción de proteína desplegada cuando el intermediario aparece y se determina con la siguiente ecuación.

$$Z = \frac{Y_{I_2 \text{ exp}} - Y_{N_2 \text{ exp}}}{Y_{U \text{ exp}} - Y_{N_2 \text{ exp}}}$$

En donde $Y_{N_2 \text{ exp}}$, $Y_{I_2 \text{ exp}}$ y $Y_{U \text{ exp}}$ son los valores experimentales que corresponden a proteína nativa, intermediario y desnaturizada respectivamente.

6.17. Ensayos de desplegamiento y replegamiento

Los ensayos para determinar el perfil de desplegamiento se llevaron a cabo con distintas concentraciones de diversos agentes caotrópicos. Para urea se utilizó un gradiente de 0 M a 9 M por 1 hasta 24 horas de incubación; para cloruro de guanidinio el gradiente fue de 0 M a 6 M con tiempos de 1 hasta 5 horas. La enzima purificada se diluyó 10 veces en la concentración correspondiente del agente caotrópico y se incubó a 25 °C por el tiempo indicado. Para analizar la actividad remanente de la proteína se utilizó el ensayo de hidrólisis de epibromohidrina utilizando como blanco la concentración de agente caotrópico a la que se encuentra la proteína.

Para comprobar la reversibilidad del plegamiento de la enzima, la muestra con proteína desplegada se trató con diversos tratamientos que consistieron en la dilución del agente desnaturizante, incubación

desde 6 hasta 24 horas y en caso necesario se añadieron agentes que favorecieran el replegamiento como arginina. El ensayo de hidrólisis de epibromohidrina sirvió como reportero de la recuperación de la actividad y por ende del replegamiento.

6.18. Análisis de la actividad enzimática

La actividad de epóxido hidrolasa consiste en la ruptura de un epóxido. Por ello se analizó la hidrólisis de epibromohidrina (EBH), generando 3-bromo-1,2-propanodiol, el cual no es fácilmente detectable, por lo que se llevó a cabo un ensayo acoplado. La reacción inicial consistió en incubar por 30 minutos 25 µg de la enzima *Pa*CIF con 10 mM de epibromohidrina a 37 °C en un volumen final de 100 µl de solución de reacción (500 mM NaCl, 20 mM fosfato de sodio a pH 7.4). La reacción se detuvo con la adición de 50 µL de una solución con 90% de acetonitrilo y 5 mM de NaIO₄ por 30 minutos a 25 °C, el peryodato es capaz de reaccionar con el diol generando tres productos que no interfieren en pasos posteriores del ensayo (Figura 6-1). Finalmente, 50 µL de 6 mM epinefrina-HCl se añadieron al tubo de reacción, la epinefrina reacciona con el peryodato remanente formando adrenocromo, el cual puede ser detectado a 490 nm; para evitar interferencias con la proteína precipitada, se centrifugó 5 minutos a 16,000 x g. 100 µl del sobrenadante se transfirieron a una placa de 96 pocillos y se midió la absorbancia a 490 nm. Para cuantificar la concentración de producto se realizó una curva estándar con un intervalo de 0 hasta 2.7 mM del reactivo comercial 3-bromo-1,2-propanodiol.

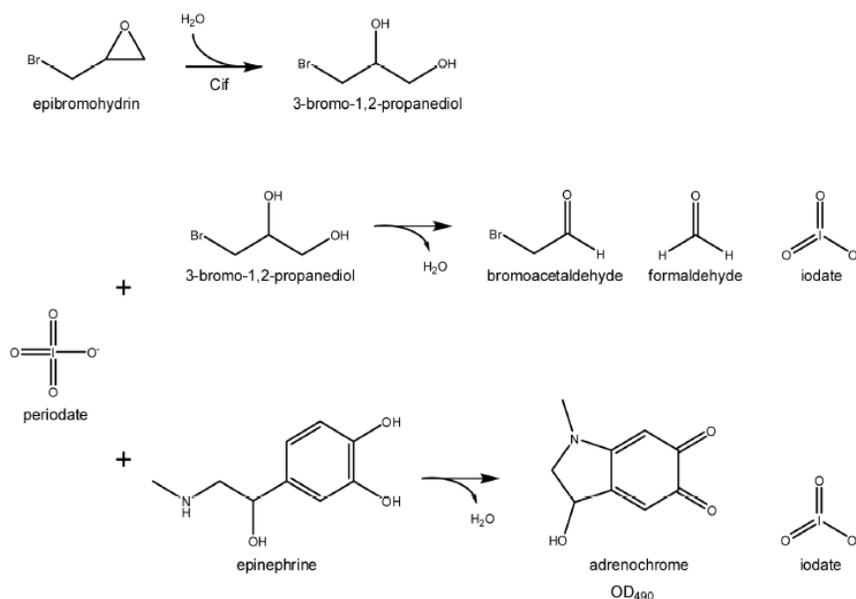


Figura 6-1. Representación esquemática de la reacción de epóxido hidrolasa

Tomado de *Bahl et al, 2010b*. La imagen permanece en su idioma original

Para ensayos de cinética enzimática se utilizó la reacción antes descrita con ciertas variaciones; inicialmente se preparó una mezcla con 3 μM de *PaCIF*, un intervalo de concentración de epibromohidrina (0, 3, 5, 10, 15, 20, 40, 60, 80 y 90 mM), en un volumen final de 1.2 mL de solución de reacción. Se utilizaron diversas temperaturas de reacción (15, 20, 25, 32, 37, 40, 41, y 42 °C). Para determinar la velocidad inicial, se transfirieron 100 μL de la mezcla inicial a diferentes tiempos (0, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 15 y 20 minutos según la temperatura y concentración de sustrato ensayados) a un microtubo con 45 μL de acetonitrilo concentrado con la finalidad de desnaturalizar la enzima y detener la reacción, esta mezcla se mantuvo a temperatura ambiente. Una vez que se tomaron 10 muestras a diferentes tiempos, se añadieron 5 μL de 50 mM NaIO_4 . Los tubos se incubaron por 30 minutos a 25 °C y se continuó con la adición de epinefrina y pasos posteriores tal cual se describió anteriormente. Los datos se trataron y analizaron utilizando el paquete computacional *GraphPad™ Prism® v 6.0*.

6.19. Análisis de parámetros termodinámicos

Las constantes de velocidad de reacción se obtuvieron a partir de un ajuste a la ecuación de Michaelis Menten a diferentes temperaturas. El cambio en capacidad calorífica se obtuvo ajustando los datos obtenidos a la ecuación de la velocidad macromolecular (eq 3) con ayuda del paquete computacional *GraphPad™ Prism® v 6.0*, el cual lleva una serie de iteraciones hasta obtener los diversos parámetros termodinámicos involucrados en la ecuación que se ajusten con un error mínimo a los datos experimentales.

$$\ln(k) = \ln\left(\frac{k_B T}{h}\right) - \frac{[\Delta H_{T_0}^\ddagger + \Delta C_p^\ddagger (T - T_0)]}{RT} + \frac{[\Delta S_{T_0}^\ddagger + \Delta C_p^\ddagger \ln(T/T_0)]}{R} \quad (\text{eq 3})$$

6.20. Construcción de pET28-*PaCIF*-MBP y pDPM73-*PaCIF*-D129S-6His

6.20.1. pET28-*PaCIF*-MBP

Amplificación del gen *PaCIF*: para obtener el producto de interés (gen codificante para *PaCIF*, con el péptido señal para secreción) se realizaron dos amplificaciones por PCR, en la primera se utilizaron los oligonucleótidos RBSCIF_FW1 y NsTevCIF_RV como iniciadores sentido y anti-sentido y el plásmido pDPM73-*PaCIF*-6His como molde (Tabla 6-1). En la segunda amplificación se utilizaron

los oligonucleótidos NRBSCIF_FW2 y NsTevCIF_RV como iniciadores sentido y anti-sentido y el producto purificado de la primera reacción de amplificación.

Amplificación del gen MBP: la secuencia codificante para el péptido de unión a maltosa se amplificó mediante PCR utilizando los oligonucleótidos SLinkMBP_FW y NspMBP_RV como iniciadores sentido y anti-sentido y el plásmido pET MBP mOrange LIC como molde (Tabla 6-1).

Nombre	Secuencia (5→3)
RBSCIF_FW1	TTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATCATATGATCCTCGATAGACTC
NRBSCIF_FW2	CATCATCCATGGCCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGG
NStevCIF_RV	CATCATGCGGCCGCGAGCTCGCCCTGAAAATACAGGTTTTTCGCGACCGCGGCTGAG
SLinkMBP_FW	CATCATGAGCTCGCAACTTATTATACAAAAGTTGTTATGAAAATCGAAGAAGGTAAA
NspMBP_RV	CATCATGCGGCCGCTTAAGTCTGCGCGTCTTTCAG
PaCIF_Mut	CCAGATACCGATGGAGTGGGCCACC

Tabla 6-1. Oligonucleótidos utilizados en el estudio

Fueron diseñados para obtener el plásmido pET28-*PaCIF*-MBP y pDPM73-*PaCIF*-D129S-6His.

Construcción de pET28-*PaCIF*-MBP: los fragmentos amplificados previamente, se purificaron con el kit comercial. Posteriormente se digirieron con la endonucleasa *SacI*. Los productos de la digestión se purificaron y ligaron para generar la fusión entre *PaCIF* y MBP. Posteriormente se purificó este fragmento y se digirió con las endonucleasas *NcoI* y *NotI* al igual que el plásmido pET28. Se llevó a cabo la ligación entre los fragmentos digeridos y purificados del plásmido y el inserto. En ambos casos la ligación se llevó a cabo con la enzima T4 DNA ligasa, se mantuvo a 16 °C por toda la noche. Finalmente, el producto ligado fue introducido por choque térmico en células quimiocompetentes de la cepa MC1061 de *E. coli*. Las células se incubaron por una hora en medio 2XYT a 37 °C para su recuperación. La suspensión bacteriana se cultivó en cajas Petri con medio LB sólido suplementado con kanamicina. De las UFC que crecieron se aislaron al menos 3 para su caracterización.

6.20.2. pDPM73-*PaCIF*-D129S-6His

La mutación D129S genera un sitio catalítico silenciado sin afectar la estructura de la enzima [Bahl et al., 2015]. Para introducir esta mutación se utilizó un oligonucleótido que produce el cambio de dos nucleótidos generando un codón codificante para serina (Tabla 6-1). Después de una ronda de PCR se obtuvo un mega-primer el cual sirvió para generar la amplificación del gen completo con la

respectiva mutación. Tanto el producto de la amplificación del gen con la mutación como el plásmido pDPM73-*Pa*CIF-6His se digirieron con las endonucleasas EcoRI y XhoI para posteriormente ligar los componentes con la enzima T4 DNA ligasa, a 16°C por toda la noche. El producto ligado fue introducido por choque térmico en células quimiocompetentes de la cepa Top10 de *E. coli*. Las células se incubaron por una hora en medio 2XYT a 37 °C para su recuperación. La suspensión bacteriana se cultivó en cajas Petri con medio LB sólido suplementado con ampicilina. De las UFC que crecieron se aislaron al menos 3 para su caracterización.

7. RESULTADOS Y DISCUSIONES

7.1. Enzimas homodiméricas

La búsqueda informática en las diversas bases de datos (PDB, UniProt, NCBI) arrojó muchos resultados, sin embargo, pocos cumplen con los requisitos de una buena proteína modelo para este proyecto. En la tabla 7-1 se muestran ciertas enzimas que se aproximan al objetivo deseado.

PROTEÍNA	ORGANISMO	REFERENCIAS
Prolina racemasa	<i>Tripanosoma cruzi</i>	[Chamonds et al., 2003] [Boschiazzo et al., 2005]
Fluoroacetato deshalogenasa	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	[Chan et al., 2011]
Fluoroacetato deshalogenasa	<i>Burkholderia sp</i>	[Kurihara et al., 2003]
β -glucosidasa	<i>Streptomyces sp</i>	[Pérez-Pons et al., 1994]
Succinato hidrolasa	<i>Mesorhizobium japonicum</i>	[Yuan et al., 2008]
Est1E/ Esterasa	<i>Butyrivibrio proteoclasticus</i>	[Goldstone et al., 2009]
CMM hidrolasa	<i>Arthrobacter globiformis</i>	[Mukai et al., 2006] [Kohno et al., 2018]
Monoacilglicerol lipasa	<i>Homo sapiens</i>	[Bertrand et al., 2009] [Navia-Paldanius et al., 2012]
Epóxido hidrolasa	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	[Bahl et al, 2010b]

Tabla 7-1. Proteínas evaluadas que cubren características deseadas

Prolina racemasa: cataliza la interconversión de L-prolina y D-prolina. Tiene 2 isoformas, siendo la de interés la isoforma A, la cual consta de 423 residuos de aminoácidos, de los cuales los primeros 31 codifican para un péptido señal para su secreción; no requiere de algún cofactor para llevar a cabo su catálisis [Chamonds et al., 2003]. Para que sea funcional requiere la formación del homodímero. Cada monómero está organizado en dominios α/β , con una triada catalítica que está formada por los residuos Cys 130, His 132 y Cys 300. Sin embargo, aparentemente es una enzima alostérica, ya que estudios de calorimetría han demostrado diferentes constantes de afinidad, así como cambios en los parámetros termodinámicos de la otra subunidad al unir un primer sustrato, indicando cambios conformacionales en la enzima [Boschiazzo et al., 2005].

Fluoroacetato deshidrogenasa: la reacción catalizada por estas enzimas consiste en la defluoronización por hidrólisis del fluoroacetato para formar glicolato. También tiene actividad sobre bromoacetato o cloroacetato solo que es más baja. Son proteínas homodiméricas con un plegamiento α/β . La proteína de *Rhodopseudomonas palustris* contiene 302 residuos de aminoácidos y una triada catalítica formada por Asp 110, Asp 134 e His 280 [Chan et al., 2011]. La proteína de *Burkholderia sp.* contiene 304 residuos de aminoácidos de cuales Asp 104 e His 271 actúan como residuos catalíticos [Kurihara et al., 2003]. A pesar de sus características estructurales aparentemente adecuadas, la determinación de la reacción enzimática genera desechos altamente tóxicos con los que no es conveniente trabajar.

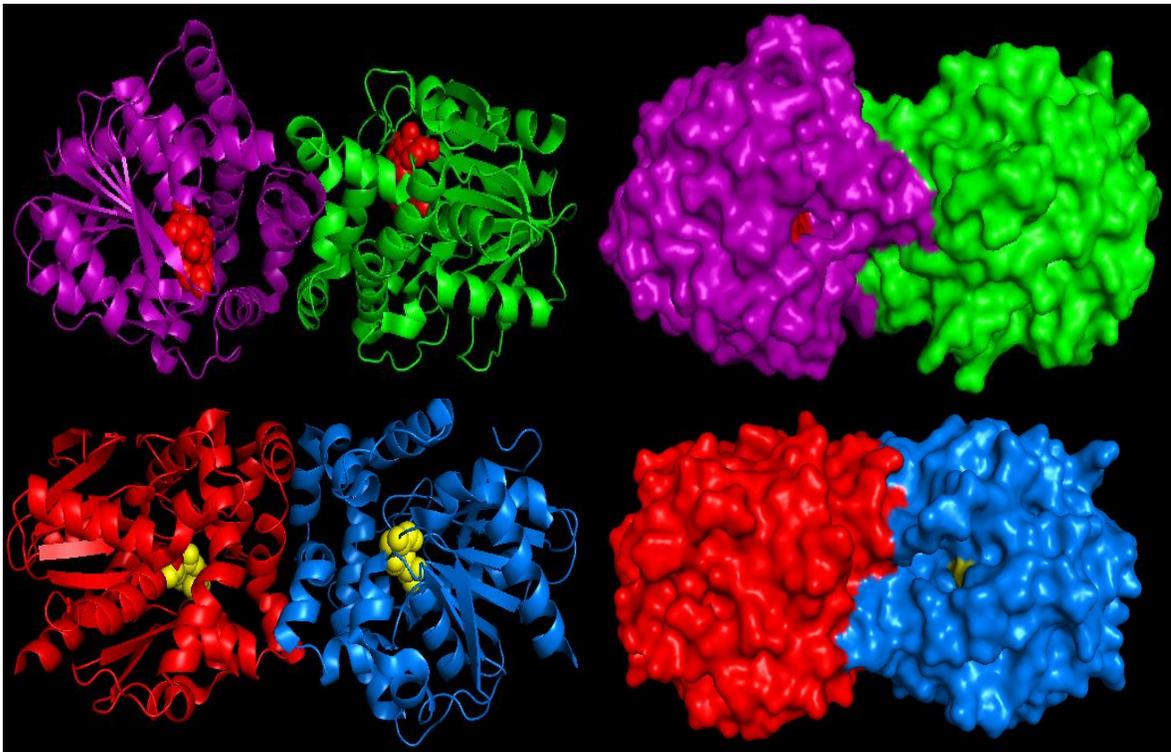


Figura 7-1. Representación de la fluoroacetato deshidrogenasa

(A) *Rhodopseudomonas palustris* PDB: 3R3V (B) *Burkholderia sp.* PDB: 1Y37
Las esferas rojas y amarillas representan los residuos catalíticos de cada subunidad.

β -Glucosidasa: Su función consiste en hidrolizar los residuos terminales no reductores de β -D-glucosil liberando β -D-glucosa. Está involucrada en la vía de degradación de celulosa y en el metabolismo de glicano. Consta de 479 residuos de aminoácidos del cual el glutamato 383 actúa como nucleófilo en la reacción [Pérez-Pons *et al.*, 1994]. Esta proteína tiene la característica de ser termoestable por lo que complica el análisis ya que el intervalo de temperatura a analizar es muy elevado.

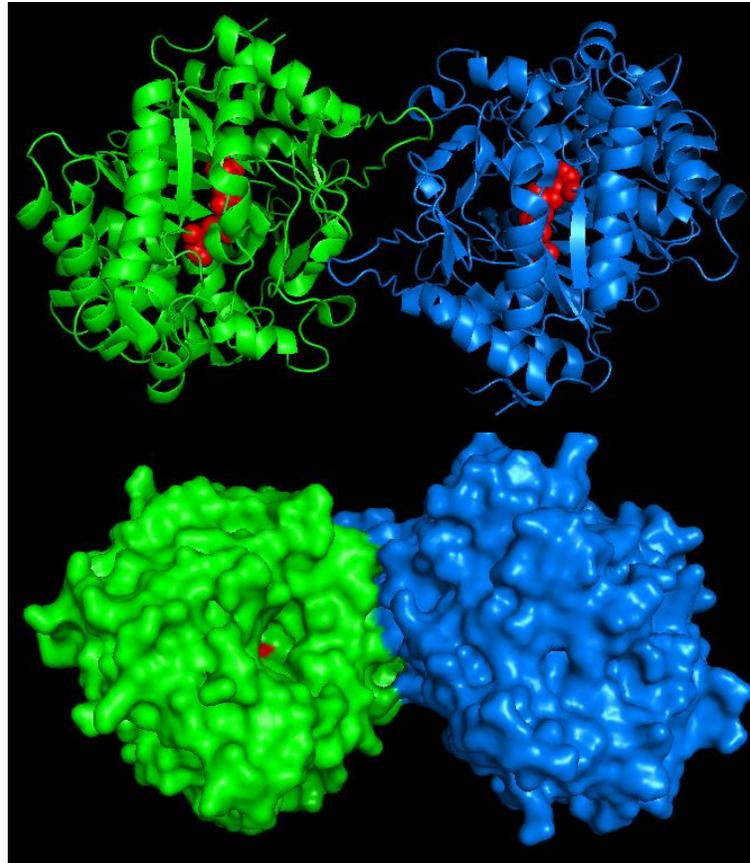


Figura 7-2. Representación de la β -Glucosidasa de *Streptomyces*

PDB: 1GNX

Las esferas rojas representan los residuos catalíticos de cada subunidad.

Succinato hidrolasa: Es la responsable de la reacción final en la degradación de vitamina B6 de (E)-2-(acetamidometileno) succinato (E-2AMS) para producir semialdehído succínico, acetato, amonio y dióxido de carbono. Se ha evaluado la actividad de esta enzima en presencia de diversos metales, sin observar cambio representativo con respecto a la enzima sin metales, lo que indica que no existe

regulación por metales [Yuan *et al.*, 2008]. Es una proteína de 278 residuos de aminoácidos con una triada catalítica compuesta por Ser 106, Asp 130 e His 258 [McCullon *et al.*, 2010]. Al analizar los parámetros cinéticos reportados, se observa que tiene una eficiencia catalítica muy alta ($3.43 \times 10^8 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$) lo cual no es lo deseado debido a que no existe un buen intervalo para observar cambios, ya que lo que limita la velocidad de reacción es la difusión del sustrato al sitio activo, no la reacción per se. Además, el sustrato que requiere para llevar a cabo la catálisis es complicado de obtener, ya que se requiere de varios pasos de síntesis química, en cuya área no se tiene experiencia.

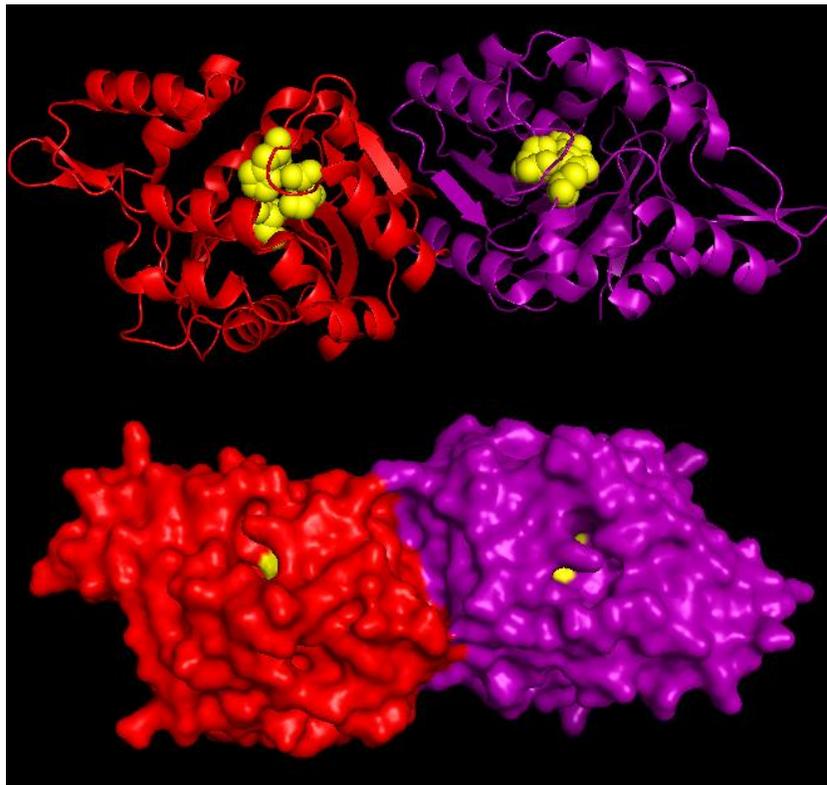


Figura 7-3. Representación de la Succinato hidrolasa de *Mesorhizobium japonicum*

PDB: 3KXP

Las esferas amarillas representan los residuos catalíticos de cada subunidad.

Est1E/Esterasa: esta enzima está involucrada en la degradación de hemicelulosa. Es una α/β hidrolasa que contiene una pequeña tapa entre la sexta y séptima hebra de la hoja β . Consta de 251 residuos de aminoácidos entre los que se forma una triada catalítica compuesta por Ser 105, Asp 197 e His 225. Para analizar la actividad de esta enzima, se han utilizado sustratos pequeños acoplados a

cromóforos como ρ -nitrofenil butirato, ρ -nitrofenil laurato y ρ -nitrofenil palmitato, al llevar a cabo la hidrólisis se libera el ρ -nitrofenol el cual puede ser detectado a 400nm [Goldstone et al., 2009]. Esta enzima aparentemente es muy buena candidata ya que su eficiencia catalítica no es tan buena y puede ser mejorada.

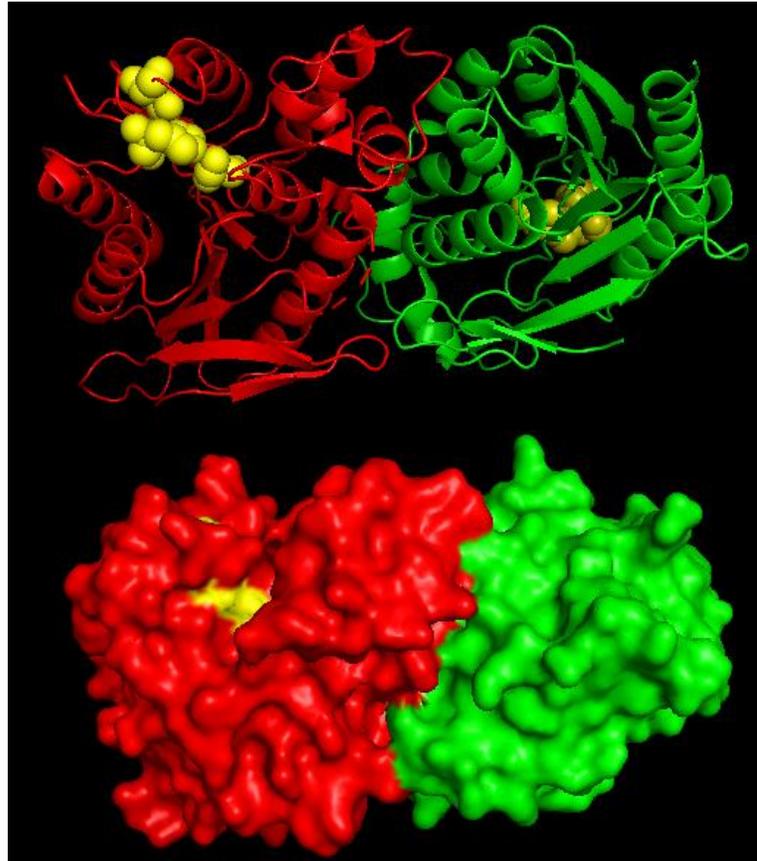


Figura 7-4. Representación de la Est1E (Esterasa) de *Butyvirbio proteoclasticus*

PDB: 2WTM

Las esferas amarillas representan los residuos catalíticos de cada subunidad.

Monoacilglicerol lipasa: es una serina hidrolasa que cataliza la hidrólisis de 2-araquidonoilglicerol (2-AG) en ácido araquidónico y glicerol. Es una α/β hidrolasa que contiene una tapa que cubre el sitio catalítico [Bertrand et al., 2009]. Esta tapa permite que la enzima se encuentre en diferentes estados: abierto y cerrado. Al cristalizarla la encuentran en forma abierta sin necesidad de agregar inhibidores o detergentes, por lo que se cree que en solución se encuentra en la forma abierta dando acceso al sitio catalítico [Labar et al., 2010]. Es una proteína de 303 residuos de aminoácidos con una triada catalítica compuesta por Ser 122, Asp 239 e His 269. Para determinar la actividad enzimática se han reportado

ensayos acoplados, en los que se cuantifica la concentración de glicerol, mediante una serie de transformaciones enzimáticas que producen compuestos que pueden ser detectados por fluorescencia o colorimetría [Navia-Paldanius et al., 2012].

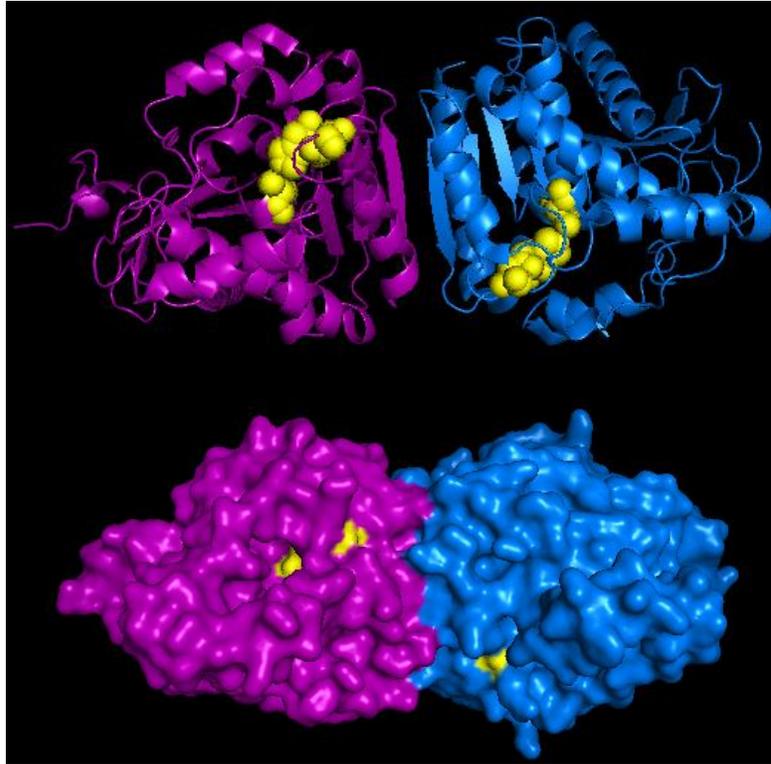


Figura 7-5. Representación de la Monoacilglicerol lipasa de *Homo sapiens*

PDB: 3HJU

Las esferas amarillas representan los residuos catalíticos de cada subunidad.

Epóxido hidrolasa: también conocida por sus siglas en inglés como CIF, factor inhibitorio de CFTR (Regulador de la conductancia transmembranal de la fibrosis quística, por sus siglas en inglés). Favorece la colonización de *P. aeruginosa* mediante la inhibición de CFTR y se ha encontrado que es capaz de hidrolizar ciertos epóxidos. Pertenece a la familia de α/β hidrolasas bacterianas y comparte ciertas características estructurales con las fluoroacetato deshalogenasas. Cada monómero está compuesto de 319 residuos de aminoácidos, de los cuales los primeros 24 codifican a un péptido señal que dirige a la proteína al exterior de la célula bacteriana. La triada catalítica está formada por los residuos Asp 129, Glu 153 e His 297. El ensayo de actividad enzimática consiste en la hidrólisis de epibromohidrina formando 3-bromo-1,2-propanodiol. Para cuantificar el producto de la reacción (3-bromo-1,2-propanodiol), es necesario llevar a cabo una reacción acoplada que genera como producto final

adenocromo, el cual es detectable a 490 nm. Esta proteína ha sido estudiada estructuralmente, contando con diferentes variantes que indican la importancia de ciertos residuos aminoacídicos, como lo es el aspartato 129, cuya sustitución por serina, abate la capacidad catalítica sin afectar la estructura tridimensional [Bahl et al., 2015].

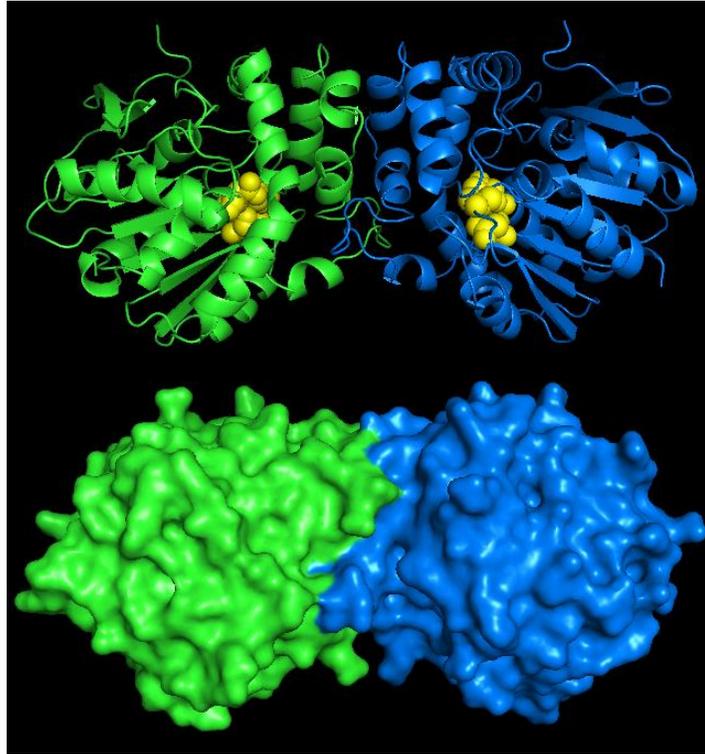


Figura 7-6. Representación de la Epóxido hidrolasa de *Pseudomonas aeruginosa*

PDB: 3KD2

Las esferas amarillas representan los residuos catalíticos de cada subunidad.

Todas las enzimas antes mencionadas se consideraron para el estudio, sin embargo, al profundizar la búsqueda, mostraron alguna característica que impide su elección. De las enzimas descritas anteriormente, las últimas tres son buenas candidatas debido a que no se ha encontrado referencia que indique que la proteína presente alguna característica indeseada. Sin embargo, la información actual de las diversas enzimas es carente y en los tres casos hay características que no han sido evaluadas impidiendo afirmar que alguna de ellas puede funcionar adecuadamente. Por ello se eligió una sola enzima para caracterizarla de acuerdo con las necesidades que muestra el proyecto general. Esta enzima fue la epóxido hidrolasa de *P. aeruginosa* debido a que la literatura muestra que existe una variante que pierde por completo su actividad enzimática, sin afectar su estructura tridimensional; además se

encuentran reportadas las condiciones de expresión y purificación de la proteína, demostrando que se obtienen cantidades adecuadas de enzima activa [Bahl et al., 2010a; Bahl et al., 2010b].

7.2. Epóxido hidrolasa de *Pseudomonas aeruginosa* (PaCIF)

La epóxido hidrolasa de *Pseudomonas aeruginosa* es un factor de virulencia que favorece la colonización de la bacteria. También se le conoce como CIF: factor inhibitorio de CFTR, ya que es capaz de inhibir CFTR el cual, es el responsable de la secreción de los iones cloruro en la superficie del líquido pulmonar, al disminuir la secreción de iones cloruro cambian las características del líquido pulmonar, generando un ambiente que permite la colonización de la bacteria [Bahl et al., 2010b].

Estructuralmente se trata de una proteína homodimérica, que sigue un plegamiento típico de una α/β hidrolasa bacteriana. Es una proteína de 319 residuos aminoacídicos, de los cuales los primeros 24 codifican para un péptido señal que permite su secreción (Figura 7-7), una vez secretada esta proteína, se pierde el péptido señal. La triada catalítica está formada por los residuos Asp 129, Glu 153 e His 297 [Bahl et al., 2010b]. Con la finalidad de describir la importancia y función de cada residuo, se han reportado diversas variantes de la proteína en la que mediante mutación sitio-dirigida logran explicar el papel de ciertos residuos. Es así como se comprobó que el residuo Asp 129 es importante para la catálisis enzimática. Se ha reportado una variante de la enzima (D129S), que provoca una pérdida de la actividad, sin alterar la estructura de la proteína [Bahl et al., 2015]. Al hacer un alineamiento estructural de los cristales de la proteína silvestre y la variante catalíticamente inactiva, se comprueba que la estructura tridimensional se mantiene con mínimos cambios estructurales, localizándose principalmente en las asas de la proteína (Figura 7-8 A), que como se sabe son las regiones que presentan mayor movimiento. Al comparar las interacciones del aspartato y la serina con los residuos catalíticos (Figura 7-8 B), se observa que las interacciones que mantiene el aspartato con Glu 153 se conservan cuando se sustituye por serina; mientras que los que mantenía el aspartato con His 297 se pierden por la ausencia del grupo carboxilo en la serina. Al hacer un acercamiento al sitio catalítico se puede ver que la serina se orienta en la misma dirección que el aspartato sin generar alteraciones en la región. Esto permite que se utilice esa mutación para silenciar una de las subunidades sin alterar la estructura tridimensional de la enzima.

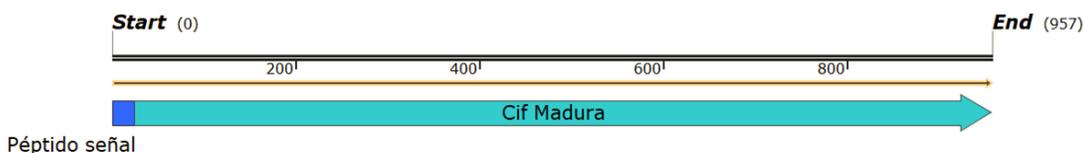


Figura 7-7. Representación esquemática del gen PA14_26090

Los números indican el número de pares de bases.

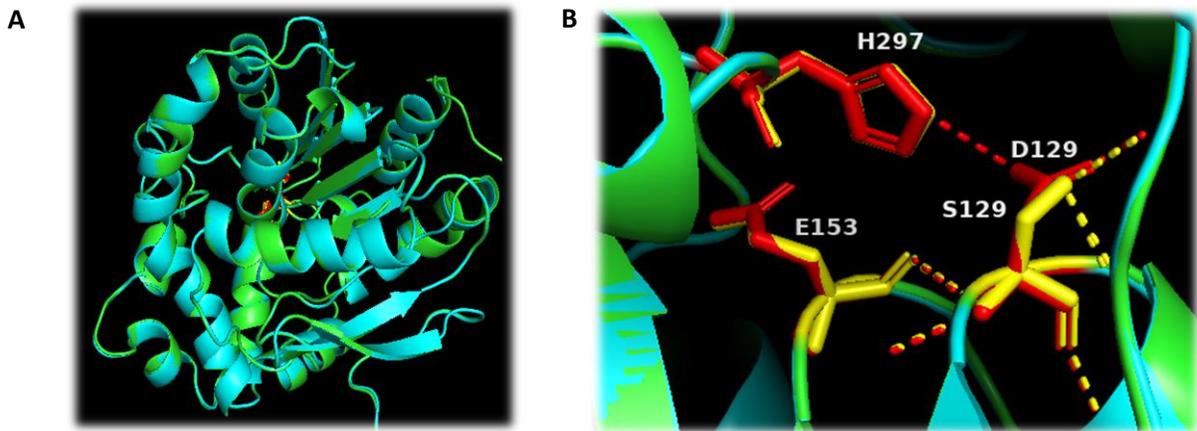


Figura 7-8. Representación de una subunidad de epóxido hidrolasa

(A) Alineamiento estructural entre la proteína silvestre (turquesa) y la variante inactiva D129S (verde). (B) Acercamiento al sitio catalítico. Residuos aminoacídicos involucrados en la catálisis. Las líneas punteadas representan las interacciones que mantiene el residuo 129. Rojo: *PaCIF* Silvestre; amarillo: *PaCIF* D129S.

Entre las diversas pruebas para caracterizar la enzima, se encontraba el ensayo de actividad en presencia de diversos cationes divalentes para analizar la posible dependencia de cofactores, mostrando que no hay diferencia significativa en la reacción enzimática en presencia de estos iones con respecto a la reacción enzimática catalizada en ausencia de iones [Bahl *et al.*, 2010b].

7.3. Construcción de pDPM73-*PaCIF*-6His

El plásmido pDPM73-*PaCIF*-6His fue proporcionado por el Dr. Christopher Bahl del Instituto de Innovación de Proteínas de Harvard. Como se mencionó en la sección 5.3. este plásmido contiene la secuencia codificante para la proteína de interés completa (incluyendo el péptido señal) con una etiqueta molecular de 6 histidinas en el carboxilo terminal, es regulado bajo el promotor de arabinosa y contiene un gen codificante a β -lactamasa lo que le confiere resistencia a ampicilina. El plásmido fue introducido mediante electroporación en la cepa Top10 de *E. coli*, cepa que permite su mantenimiento, replicación y como sistema de expresión. Posteriormente fue cultivada en medio LB sólido suplementado con ampicilina. Se seleccionaron 3 UFC capaces de crecer en medio con antibiótico y se cultivaron en medio LB líquido suplementado con ampicilina. Después se purificó el plásmido de dos clonas y se analizó por un ensayo de digestión con endonucleasas (Figura 7-9). Para este ensayo se utilizó la endonucleasa EcoRI para la digestión sencilla y las endonucleasas NheI y XhoI para la doble digestión. Se obtuvieron los productos de digestión esperados, la digestión sencilla (DS) genera un fragmento de 8266 pb que corresponde al plásmido linealizado y la doble digestión (DD) genera dos fragmentos de 7647 pb y 619

pb. Estos datos nos arrojan un resultado preliminar del contenido del plásmido, indicando que aparentemente la información se encuentra organizada tal como se representa en el esquema de la Figura 5-1. Para confirmar el resultado anterior, se realizó un análisis de secuenciación de DNA al gen que codifica a la epóxido hidrolasa presente en el plásmido pDPM73. Los resultados comprobaron que la secuencia corresponde con lo reportado [MacEachran et al., 2007].

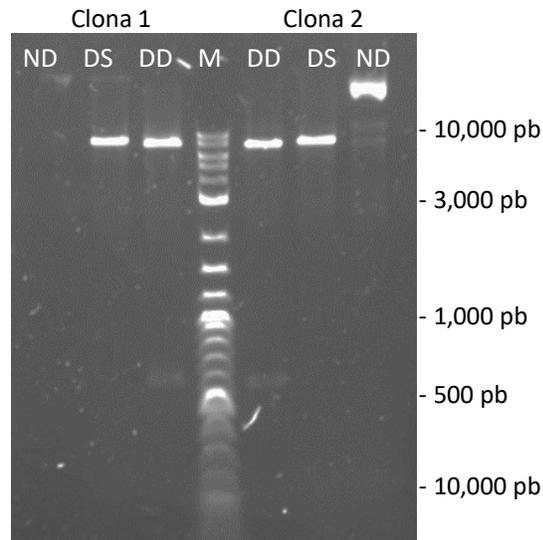


Figura 7-9. Análisis molecular del plásmido pDPM73-*PaCIF*-6His

ND: No digestión; DS: Digestión sencilla; DD: Doble digestión. M: Marcador de pesos moleculares.

7.4. Expresión de *PaCIF*

En un intento por caracterizar la expresión de la proteína *PaCIF*-6His, se llevó a cabo la inducción de la expresión de proteína en medio Terrific Broth suplementado con ampicilina. Tras un periodo de pre-inducción, la sobreexpresión de la proteína se llevó a cabo mediante la adición de 0.1% y 0.2% de arabinosa e incubación a 37 °C. Se tomaron muestras del sobrenadante a diversos tiempos para determinar el tiempo adecuado de inducción. Los tiempos analizados se observan en la Figura 7-10. La proteína se secreta como dímero, pero al someterla a un tratamiento tradicional de desnaturalización (incubar la muestra por 10 minutos a 95 °C, en una solución amortiguadora que contiene SDS y β -mercaptoetanol), se debería encontrar en el sobrenadante como monómero de 33.3 kDa, sin embargo, se observa una banda por debajo de 32 kDa, que corresponde a la enzima y esto puede ser debido a un patrón de migración anómalo.

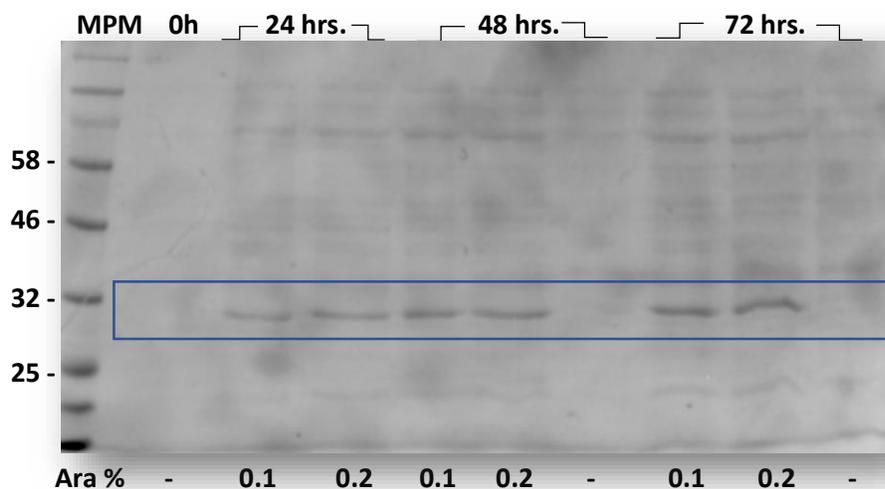


Figura 7-10. Análisis de expresión de la proteína secretada *PaCif* en *E. coli* Top 10
 SDS-PAGE 12% Teñido con azul de Coomasie. MPM: Marcador de pesos moleculares

A pesar de ser una proteína secretable, se analizó la pastilla celular en búsqueda de proteína en el espacio intracelular (Figura 7-11). Los resultados muestran una banda sobreexpresada en el interior de la célula, indicando la presencia de la proteína. Conforme avanza el tiempo la intensidad de la banda es menor, evidenciando que la proteína está siendo secretada.

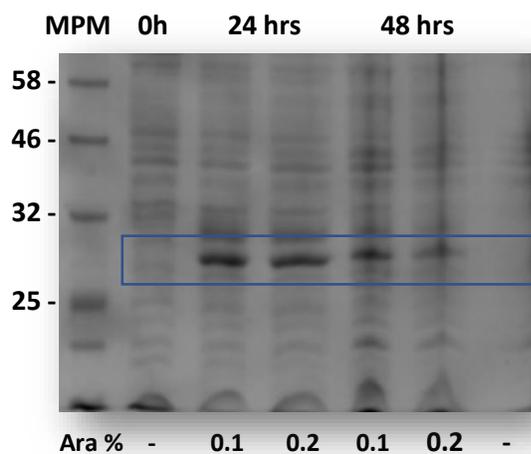


Figura 7-11. Análisis de expresión de la proteína *PaCif* en el contenido celular de *E. coli* Top 10
 SDS-PAGE 12% Teñido con azul de Coomasie. MPM: Marcador de pesos moleculares.

Posteriormente las fracciones correspondientes a proteína secretada a las 48 y 72 horas fueron purificadas por afinidad a metales. Con el fin de cuantificar la proteína producida y establecer las condiciones de purificación, solo se tomaron las que fueron inducidas con 0.1% de arabinosa ya que el gel no muestra gran diferencia entre 0.1% y 0.2%. La concentración observada al variar el tiempo de inducción no fue muy diferente, obteniendo 0.8 mg/mL a las 48 horas y 0.9 mg/mL a las 72 horas, por lo que se establecieron como condiciones adecuadas una inducción a 48 horas y 0.1% de arabinosa en medio Terrific Broth. Teniendo en cuenta estas condiciones, se llevó a cabo la inducción de *PaCIF* en 300 mL de medio Terrific Broth suplementado con ampicilina. Se separó el medio extracelular del paquete celular con ayuda de centrifugación en frío. El sobrenadante se filtró con membrana de 0.22 μ m para purificar en una resina de agarosa-níquel, la proteína se eluyó con una solución que contenía 500 mM NaCl, 20 mM fosfatos e imidazol 250 mM y 500 mM. La Figura 7-12 muestra el análisis del proceso de purificación. En el sobrenadante se observa una banda sobreexpresada que corresponde a la proteína secretada, en la fracción no pegada (FNP) se puede ver una ligera banda del tamaño de la sobreexpresada, indicando presencia de proteína en esta fracción, posiblemente por una sobresaturación de la columna. En la fracción que corresponde al lavado (W) no se ve banda notoria correspondiente a la proteína de interés. Las eluciones 1 - 4 fueron obtenidas con 250 mM imidazol y las eluciones 5 - 7 con 500 mM imidazol, obteniendo una banda con mayor intensidad en la elución 4, sin embargo, esto ha sido variable entre varios lotes de purificación.

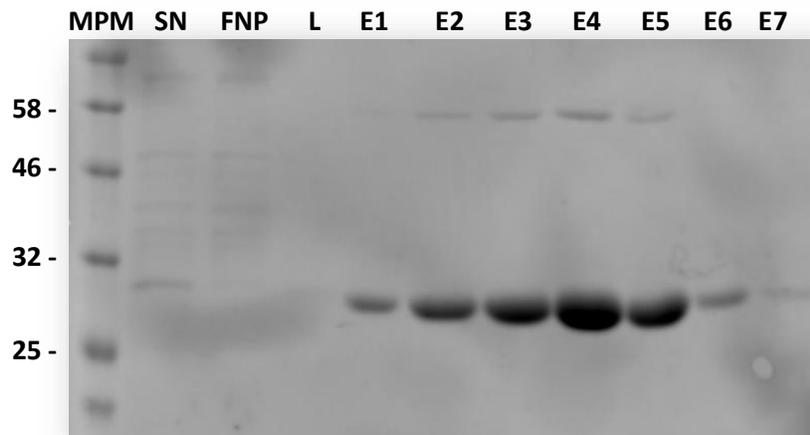


Figura 7-12. Proteína purificada del medio Terrific Broth de *E. coli* Top 10

SDS-PAGE 12% Teñido con azul de Coomassie. MPM: Marcador de pesos moleculares. SN: Sobrenadante. FNP: Fracción no pegada. L: Lavado. E1-E4: Eluciones 1-4 con 250 mM imidazol. E5-E7: Eluciones 5-7 con 500 mM Imidazol

Una vez analizada la expresión de la proteína en medio rico, era necesario conocer cómo se comportaba en medio mínimo, ya que es el medio que será utilizado para la expresión de la proteína con isótopos pesados. Por lo que se preparó un cultivo de 1 L de medio mínimo suplementado con ampicilina, utilizando como control positivo un cultivo de 400 mL de Terrific Broth suplementado con ampicilina. Ambos cultivos siguieron las condiciones de expresión y purificación indicadas anteriormente. Las eluciones 2-5 de cada proceso de purificación se mezclaron en un tubo cónico. Se tomaron 15 μ L de cada mezcla de proteína purificada y se cargaron en un gel de poliacrilamida (Figura 7-13 A). Al cuantificar por Bradford la proteína purificada en ambas inducciones se obtuvieron concentraciones de ~ 8.14 mg por 400 mL de cultivo Terrific Broth y ~ 0.10 mg de proteína por 1 L de cultivo en medio mínimo. Con el fin de favorecer la secreción de la proteína, se preparó otro cultivo para inducir la expresión de la proteína en 100 mL de medio mínimo suplementado con una mezcla de metales a 30 °C y 37 °C, se analizó por SDS-PAGE la presencia de la proteína en la fracción extracelular e intracelular (Figura 7-13 B). Los resultados muestran que la proteína se queda en el paquete celular, y pareciera que a 30 °C se favorece la sobreexpresión.

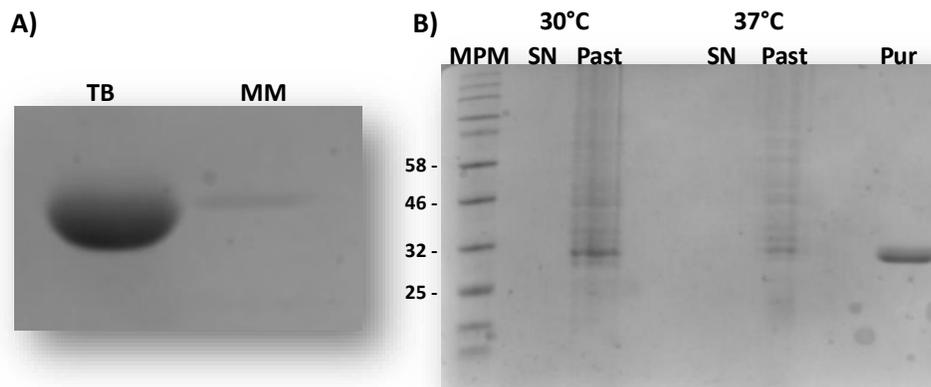


Figura 7-13. Análisis de expresión de la proteína *PaCif* en medio mínimo

A) Comparación entre la expresión de *PaCif* en medio Terrific Broth y medio mínimo. B) Localización de la proteína en los diferentes compartimentos celulares.

SDS-PAGE 12% Teñido con azul de Coomassie. TB: Terrific Broth. MM: Medio mínimo. MPM: Marcador de pesos moleculares. SN: Sobrenadante. Past: Pastilla. Pur: *PaCif* purificada.

Ya que se trata de una proteína secretable, existe la posibilidad de que el sistema de secreción en este medio no sea tan eficiente y por lo tanto la proteína pudiera quedarse atrapada en el periplasma, para analizar esta opción, se extrajo la fracción periplásmica con el protocolo previamente descrito

(sección 6.7). La Figura 7-14 A muestra los diferentes compartimentos celulares, en los cuales se puede observar que se concentra buena cantidad de proteína tanto en la extracción con solución hipertónica (sacarosa) como en solución hipotónica (sulfato de magnesio). También se realizó una lisis celular para analizar la cantidad de proteína que se quedaba en el espacio intracelular; en la Figura 7-14 A se puede observar que aún queda proteína en esta fracción, pero es mínima comparada con la encontrada en el periplasma bacteriano, incluso es menor que la encontrada en los restos celulares. Se juntaron ambas fracciones de proteínas periplásmicas para purificar *PaCIF* en las condiciones ya mencionadas. La cantidad obtenida fue de 0.81 mg y 1.15 mg de proteína en periplasma bacteriano de 100 mL de cultivo a 30 °C y 37 °C, respectivamente, lo cual aún no alcanza la producción obtenida en medio rico, pero al menos ya puede ser utilizado para futuros experimentos. La intensidad de las bandas correspondientes a la proteína de interés muestra que a 30 °C existe mayor sobreexpresión, y además mayor pureza comparado con la obtenida a 37 °C, por lo que se estableció que la temperatura a la que se llevará la inducción de la expresión proteica será de 30 °C.

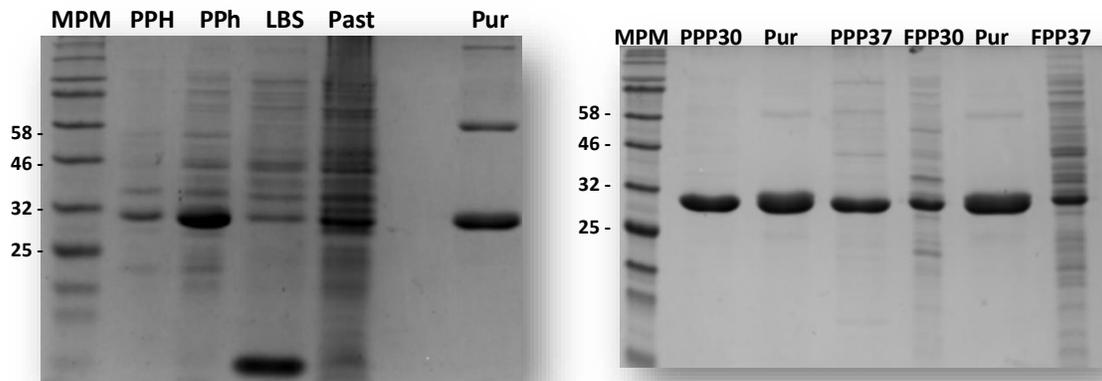


Figura 7-14. Análisis de presencia *PaCIF* en espacio periplásmico de *E. coli* Top 10

A) Localización de la proteína *PaCIF* B) Extracción con solución hipotónica e hipertónica a 30 °C y 37 °C y purificación comparado con proteína secretada purificada.

SDS-PAGE 15% Teñido con azul de Coomassie. MPM: Marcado de pesos moleculares. PPH: Fracción periplásmica hipertónica. PPh: Fracción periplásmica hipotónica. LBS: Lisado bacteriano soluble. Past: Pastilla con restos celulares. Pur: Proteína *PaCIF* purificada utilizada como referencia. PPP30: Proteína *PaCIF* periplásmica purificada proveniente de un cultivo a 30 °C. PPP37: Proteína *PaCIF* periplásmica purificada proveniente de un cultivo a 37 °C. FPP30: Fracción periplásmica proveniente de un cultivo a 30 °C. FPP37: Fracción periplásmica proveniente de un cultivo a 37 °C.

El siguiente cuestionamiento fue: al tener la proteína en periplasma, ¿logra perder el péptido señal o lo mantiene? Para intentar resolver esto se realizó un análisis SDS-PAGE al 15% para comparar el tamaño de las proteínas de periplasma contra la proteína secretada. La Figura 7-14 B muestra este

resultado, la proteína de periplasma se comporta de forma similar a la proteína secretada, indicando que pierde el péptido señal. Además, se llevó a cabo una prueba de actividad utilizando como sustrato epibromohidrina (bajo las condiciones previamente descritas en la sección 6.18). La actividad específica es de 0.250 ± 0.007 U/mg para la enzima purificada de medio extracelular y de 0.239 ± 0.003 U/mg para la enzima purificada de periplasma. Estos valores indican que la enzima purificada de periplasma es capaz de hidrolizar la epibromohidrina con la misma eficiencia que lo hace la enzima purificada a partir de medio extracelular. Ambos lotes de proteína muestran una actividad específica correspondiente a lo previamente reportado en la literatura, cuyo valor es de 0.25 U/mg [Bahl et al., 2010b]. Con estos resultados se demuestra que se puede utilizar la proteína obtenida de periplasma para futuros ensayos donde se requiera utilizar medio mínimo.

7.5. Caracterización del estado oligomérico de la proteína

Como se describió en la sección anterior, se lograron buenos niveles de expresión. La siguiente cuestión fue averiguar el estado oligomérico de la proteína purificada, reportes previos demuestran que se trata de un dímero [Bahl et al., 2010b], sin embargo, era necesario comprobar que en solución solo existiera la forma dimérica de la proteína. Para ello se realizaron ensayos de electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones nativas (sección 6.10.) Los geles nativos dependen de la masa y carga de la proteína, por ello se utilizaron diferentes proteínas globulares que permitieran dar una idea de dónde se debía encontrar la banda correspondiente al dímero y al monómero. Para ello se utilizaron como proteínas de referencia BSA (albúmina de suero bovino) y AmyA (α -amilasa) con una masa molecular de 66.4 kDa y 65 kDa respectivamente. Como se muestra en la Figura 7-15, el patrón de migración fue distinto al esperado ya que se observa más de una banda por carril (flechas negras en la imagen), lo que impide determinar el tamaño estimado de la proteína. Sin embargo, se puede observar que la banda de PaCIF (flecha roja) se ubica entre las bandas correspondientes a BSA y AmyA, sugiriendo que en solución se encuentra la forma dimérica de la enzima.

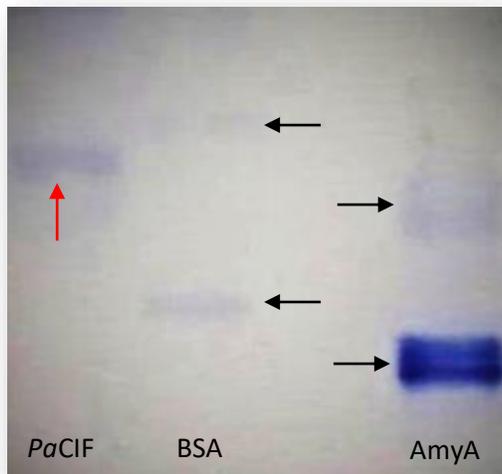


Figura 7-15. Análisis del estado oligomérico de *PaCIF* por PAGE nativo

PAGE 10% Teñido con azul de Coomassie. Las flechas indican las diferentes bandas observadas; rojo: *PaCIF*; negro: proteínas de referencia.

Los resultados anteriores no permiten concluir con certeza el estado oligomérico de *PaCIF*, por lo que se procedió a hacer un análisis de cromatografía de exclusión molecular (sección 6.13). Para esto se utilizó una columna Superose® 12 10/300 GL. Para la curva estándar se utilizaron las proteínas BSA, BLG, CTH y DHQ (Tabla 7-2), las masas moleculares se indican en la tabla. Se realizó una corrida para cada proteína para evitar que los picos se juntaran, los volúmenes de elución de cada proteína se indican en la Tabla 7-2. Para generar dicha curva estándar, se graficó el volumen de elución contra el logaritmo de la masa molecular de la proteína, ajustando los datos a un modelo de regresión lineal, el cual arrojó un valor de R^2 de 0.9866. El volumen de elución de *PaCIF* fue de 12.58 ml y 12.48 ml para la silvestre y variante D129S respectivamente, (las características de la variante D129S se describen más adelante) arrojando un solo pico indicando que solo se tiene un estado oligomérico en solución. Para determinar la masa molecular correspondiente al volumen de elución se utilizó la ecuación que arroja la curva estándar (Figura 7-16) obteniendo valores experimentales de 48.5 kDa y 50.2 kDa para la silvestre y la variante D129S respectivamente. No es el valor calculado teóricamente correspondiente al dímero (66.57 kDa), sin embargo, pareciera que la proteína se comporta como una proteína más pequeña, ya que incluso mediante la separación por electroforesis en condiciones desnaturizantes, que es una técnica con un principio distinto, se obtienen bandas que corresponden al monómero con una masa

molecular menor a 32 kDa (Figura 7-10 y 7-12). No se tiene evidencia que permita explicar este comportamiento. Con esta información y al observar un único pico de elución por cromatografía de exclusión molecular, se puede decir que tenemos una sola especie aparentemente dimérica.

Proteína	MM (kDa)	Volumen de elución (ml)
DHQ	80 (dímero)	11.16
BSA	66.4	11.79
BLG	40 (dímero)	12.92
CTH	29.4	14.10
<i>PaCIF</i> Wt	66.6 (dímero)	12.58
<i>PaCIF</i> D129S	66.6 (dímero)	12.48

Tabla 7-2. Análisis del estado oligomérico de *PaCIF* por cromatografía de exclusión molecular

Proteínas utilizadas para el ensayo. BSA: Albúmina de suero bovino; BLG: Beta lactoglobulina; CTH: Proteasa Sumo; DHQ: 3-dehidroquinato deshidratasa; *PaCIF* Wt: Epóxido hidrolasa silvestre; *PaCIF* D129S: Variante inactiva de la epóxido hidrolasa. Las masas moleculares corresponden a datos reportados.

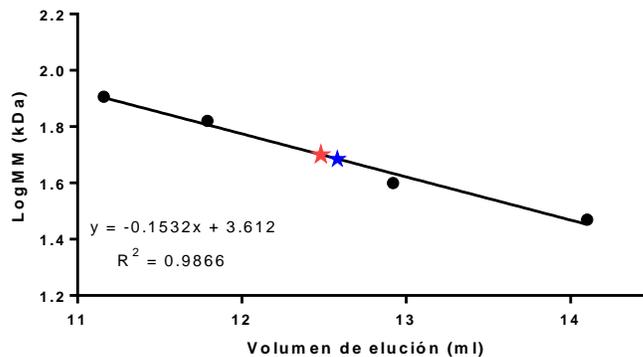


Figura 7-16. Curva estándar para el análisis del estado oligomérico de *PaCIF* por cromatografía de exclusión molecular

Curva estándar (en negro) con las proteínas descritas en la tabla 7-2. Las estrellas corresponden a la proteína *PaCIF* (azul-silvestre; roja-D129S)

7.6. Despliegamiento y reversibilidad del plegamiento de *PaCIF*

La estrategia experimental propuesta en el proyecto global, incluye la formación de un heterodímero compuesto de una subunidad de forma silvestre (subunidad A, para fines prácticos) y de otra subunidad catalíticamente inactiva y expresada con isótopos pesados (subunidad B, para fines prácticos). *PaCIF* se expresa como homodímero, por ello tanto la subunidad A como la subunidad B se encontrarán de forma dimérica al momento de su expresión. Para lograr la formación del heterodímero

se pretende desnaturalizar ambos homodímeros (AA y BB), para posteriormente hacer una mezcla equimolar de cada muestra desnaturalizada para obtener la mezcla con AA, BB y AB; siendo esta última la de interés. Una vez aislado AB se desea que no exista intercambio de subunidades de forma nativa, ya que esto daría origen a que AB se convirtiera de nuevo en una mezcla AA, BB y AB. Por ello es necesario caracterizar el perfil de desplegamiento de la enzima, ya que se busca obtener los monómeros en condiciones desnaturalizantes o en dado caso que la dimerización ocurra durante el proceso inicial del plegamiento, evitando así la disociación de la proteína en condiciones nativas. Es importante evidenciar que la proteína presente un plegamiento reversible, ya que como se mencionaba antes, después de desnaturalizar los homodímeros, se pretende que vuelvan a plegarse formando las diferentes versiones del dímero.

Con la finalidad de caracterizar el perfil de desplegamiento, se realizaron análisis de desnaturalización por gradiente de concentración de urea y cloruro de guanidinio, analizando la estructura secundaria mediante dicroísmo circular y la estructura terciaria mediante fluorescencia intrínseca de triptófanos. Para conocer el comportamiento de la enzima en cuestión, se analizó la estructura secundaria por dicroísmo circular mediante un barrido de 190 hasta 260 nm para la proteína en condiciones nativas y en presencia de 9 M urea. El espectro de dicroísmo circular se puede observar en la Figura 7-17. Al ser una proteína rica en alfa hélices, la máxima señal se muestra a 222 nm. La proteína plegada muestra una señal de -104 mdeg, mientras que, *PaCIF* en 9 M urea después de 4 horas, mantiene una señal de -6.4 mdeg, que, aunque indica una gran pérdida de estructura secundaria, aún presenta una señal que impide afirmar que la proteína se ha desplegado por completo. Para este análisis se utilizó 1.1 mg/mL de proteína ya que posteriormente se intentó diluir la urea para analizar el proceso de replegamiento, el cual tampoco fue satisfactorio; ya que al hacer una dilución 1:5 (1.8 M concentración final urea, 0.22 mg/mL concentración final de proteína) la proteína precipitó en cuanto entró en contacto con la solución amortiguadora libre de urea. La cinética de replegamiento se siguió por 45 minutos sin observar alguna señal que indicara el replegamiento de la enzima, se incubó toda la noche en frío, sin mostrar cambio alguno.

Para determinar el perfil de desplegamiento se utilizó como concentración final 0.3 mg/mL de la enzima, en un gradiente de 0 M a 9 M urea, las muestras se incubaron a 25 °C por un período superior a 24 horas. Como se observa en la Figura 7-18 la proteína muestra una gran estabilidad ante la urea, después de 24 horas no se obtienen suficientes puntos para definir la región de la postransición para la enzima desnaturalizada. Por lo que no es posible determinar un perfil adecuado de desplegamiento, permitiendo solo estimar que la concentración media de desplegamiento con urea se encuentra entre 6 M y 8 M.

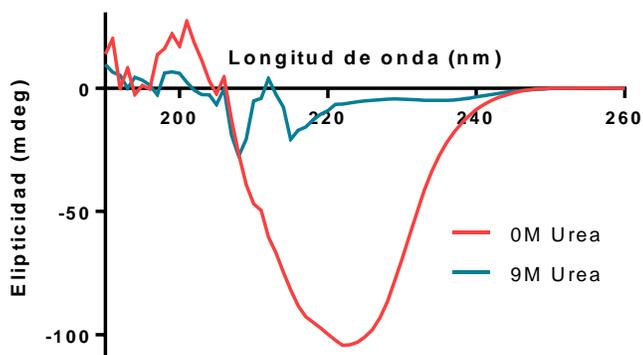


Figura 7-17. Espectro de dicroísmo circular de *PaCIF*

La curva roja representa la proteína en condiciones nativas mientras que la curva azul condiciones desnaturizantes. 1.1 mg/ml de proteína.

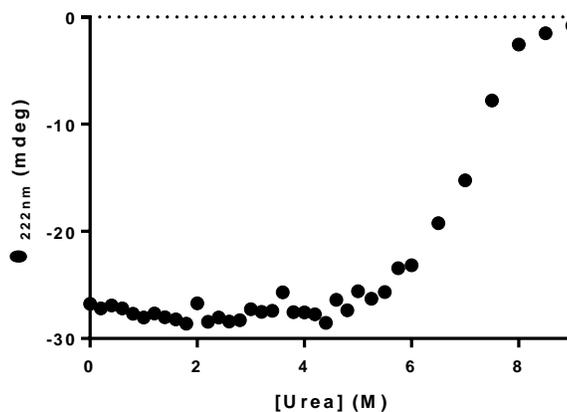


Figura 7-18. Curva de desplegamiento de *PaCIF* con urea

Datos obtenidos por dicroísmo circular

Con los experimentos de dicroísmo circular se mostró que la enzima no pierde por completo la estructura secundaria al incubarse en distintas concentraciones de urea. Sin embargo, para los ensayos a futuro no se requiere que la enzima se desnaturalice por completo, solo es necesario que el dímero se disocie y al no contar con un perfil de desnaturalización confiable no podemos determinar si esto ocurre. Por ello se realizaron ensayos de actividad de epóxido hidrolasa después de incubar con determinadas concentraciones de urea y a distintos tiempos. En la Figura 7-19 se puede observar la actividad residual de la enzima después de incubar 4 y 24 horas a 25 °C en diversas concentraciones de urea. Los resultados concuerdan con lo que se obtiene a partir de dicroísmo circular, para que la proteína pierda actividad es necesario incubar por periodos muy largos de tiempo a concentraciones muy altas de urea. Sin embargo,

la urea después de largos periodos de tiempo puede sufrir alteraciones como la formación de cianatos, los cuales son capaces de transformarse en ácido isociánico. Este último es capaz de interactuar con las cadenas laterales de ciertos aminoácidos como lisina, arginina y cisteína, así como con el extremo amino terminal [McCarthy et al., 2003] lo cual no es conveniente para el objetivo de este proyecto.

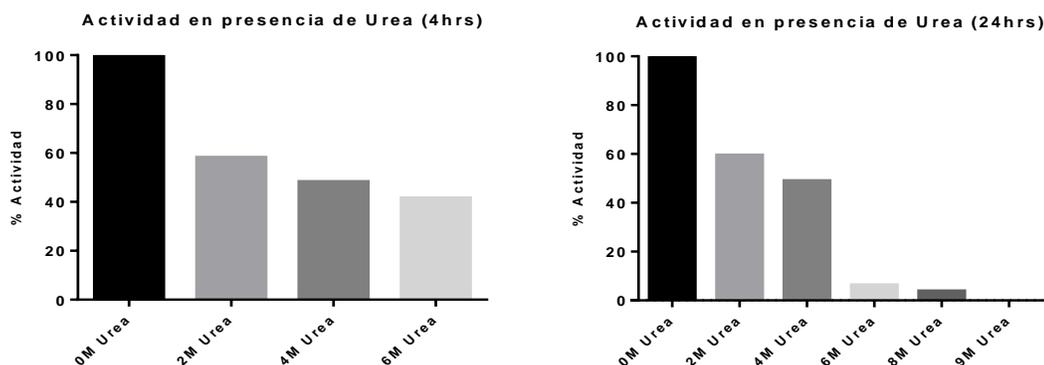


Figura 7-19. Desplegamiento con urea de PaCIF

Ensayo de actividad residual mediante la hidrólisis de epibromohidrina.

* Ensayo único.

El perfil de desplegamiento se logró determinar al incubar la proteína por 4 horas en un rango de 0-6 M de cloruro de guanidinio como agente desnaturizante. Se utilizó dicroísmo circular y fluorescencia intrínseca de triptófanos para analizar el comportamiento de la enzima. La proteína cuenta con 5 triptófanos en cada subunidad (Figura 7-20 A y B) y uno de ellos se encuentra en la interfaz de dimerización (Trp 176). Este triptófano parece ser importante para evidenciar la disociación del dímero, ya que, a diferencia de los otros 4 triptófanos, el área de superficie de exposición a solvente (SASA) cambia significativamente entre el dímero y el monómero (de 9 \AA^2 a 103 \AA^2). Sin embargo, al analizar las distancias entre los anillos aromáticos de estos dos triptófanos (Figura 7-20 C), se observa una distancia muy corta (6.4 \AA), sugiriendo que en la forma dimérica nativa existe un apagamiento de la fluorescencia (en inglés conocido como “quenching”). Por lo que el comportamiento de este par de triptófanos no puede ser predicho fácilmente. Son muchos los factores a considerar para determinar la contribución de cada triptófano a la fluorescencia intrínseca, pero si se analizan las distancias entre los anillos aromáticos de cada uno de los triptófanos de la misma subunidad (Trp 67, Trp 70, Trp 133, Trp 176 y Trp 298), pareciera que la mayor contribución a la fluorescencia está dada por Trp 133 ya que las distancias que mantiene con el resto de los triptófanos es mayor a 13 \AA .

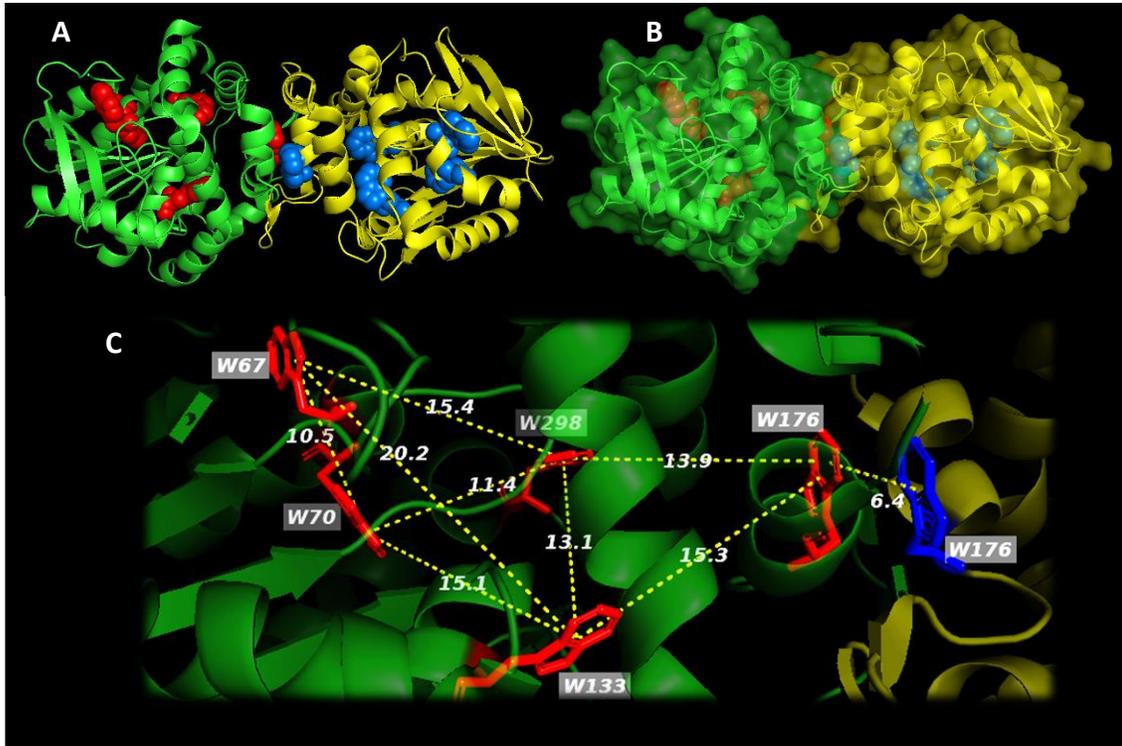


Figura 7-20. Ubicación de triptófanos en *PaCIF*

A: Representación en caricatura (cartoon); B: Representación de superficie; C: Representación en caricatura de las distancias entre triptófanos

Verde: cadena principal de la subunidad A. Amarillo: cadena principal de la subunidad B. Rojo: triptófanos presentes en la subunidad A. Azul: triptófanos presentes en la subunidad B. Las distancias se midieron entre los anillos aromáticos de los triptófanos. El triptófanos 176 es el que se encuentra en la interfaz del dímero.

El comportamiento de desplegamiento no sigue un modelo de dos estados (línea discontinua roja en la Figura 7-21); como se observa en la Figura 7-21, los datos experimentales de la proteína tratada con concentraciones arriba de 3 M de cloruro de guanidinio, muestran una ligera pendiente, distinta a la correspondiente a la población completamente desnaturalizada, (sobre todo en datos de dicroísmo circular, Figura 7-21 A y B) sugiriendo la presencia de un estado intermediario en el desplegamiento. El tratamiento de datos se llevó a cabo con ayuda de Savuka, se intentaron ajustar a un modelo de tres estados en donde el intermediario es dimérico ($N_2 \leftrightarrow I_2 \leftrightarrow 2U$) o a un modelo de tres estados donde el intermediario es monomérico ($N_2 \leftrightarrow 2I \leftrightarrow 2U$), las ecuaciones utilizadas para cada modelo se describen en la sección 6.16. Cuando se intentó hacer el ajuste con el modelo $N_2 \leftrightarrow I_2 \leftrightarrow 2U$, el resultado arrojado del valor del factor Z (descrito en la sección 6.16) fue de 1, evidenciando que no se logró reconocer esta diferencia de pendiente como un intermediario. Los datos correspondientes a este ajuste se presentan en líneas discontinuas negras en la Figura 7-21, simulando un comportamiento de dos estados. El ajuste se consiguió cuando se utiliza el modelo $N_2 \leftrightarrow 2I \leftrightarrow 2U$, indicando la presencia de un intermediario

monomérico. El modelo utilizado asume que el plegamiento es reversible; se tienen datos experimentales (descritos más adelante-Figura 7-24) que muestran que la proteína después de un tratamiento de replegamiento logra recuperar la actividad enzimática, demostrando que el plegamiento es reversible. Sin embargo, se desconoce si el camino que toma la proteína al replegarse es el mismo que sigue cuando se lleva a cabo la desnaturalización, pues no se realizó la curva inversa. Los datos observados en la Figura 7-21, sugieren que la presencia del monómero se obtiene una vez que la proteína casi termina su desplegamiento, lo cual favorece al objetivo principal del proyecto, ya que se requiere que la disociación del dímero sea mínima o nula en condiciones no desnaturalizantes. Sin embargo, es necesario llevar a cabo otro tipo de experimentos como lo es cromatografía de exclusión molecular en presencia de cloruro de guanidinio, para comprobar a qué concentración de agente desnaturalizante se lleva a cabo la disociación del dímero de *PaCif*. Los datos termodinámicos obtenidos de cada curva se encuentran en la Tabla 7-3; mostrando que el comportamiento inicial de desplegamiento es muy similar con las distintas técnicas y concentraciones de proteína, mientras que la variación se encuentra en el desplegamiento del intermediario. Esto debido principalmente a que no se cuentan con suficientes puntos experimentales en donde la proteína este completamente desplegada como para hacer un mejor ajuste. Se determinó el factor Z (descrito en la sección 6.16), el cual es de 0.88 lo que indica que el intermediario se presenta cuando la proteína ha perdido el 88% de estructura. Al no ser tan notoria la presencia del intermediario monomérico en los ensayos de fluorescencia como lo es en los ensayos de dicroísmo circular, permite suponer que, al momento de la disociación del dímero, la estructura tridimensional se encuentra altamente afectada aparentando que solo mantiene elementos de estructura secundaria.

Ensayo	ΔG_{n-i} (kcal/mol)	A_{n-i} (kcal/mol M)	C_{m-n-i} (M)	ΔG_{i-u} (kcal/mol)	A_{i-u} (kcal/mol M)	C_{m-i-u} (M)
A) DC 0.3 mg/ml	23.4 ± 1.0	5.9 ± 0.4	2.8	5.66 ± 4.90	1.33 ± 1.14	4.3
B) DC 0.1 mg/ml	23.1 ± 2.9	5.6 ± 1.1	2.8	10.9 ± 18.05	2.68 ± 4.39	4.1
C) Fluo 0.1 mg/ml	22.5 ± 1.2	5.2 ± 0.4	2.9	7.26 ± 6.74	1.64 ± 1.53	4.4
D) Fluo 0.05 mg/ml	22.5 ± 1.6	5.1 ± 0.7	2.9	3.52 ± 4.87	0.88 ± 0.13	4.0

Tabla 7-3. Datos termodinámicos del desplegamiento

Los valores fueron obtenidos con Savuka a través del tratamiento de datos experimentales mostrados en la Figura 7-21. El ajuste utilizado sigue un modelo $N_2 \leftrightarrow 2I \leftrightarrow 2U$. C_m se obtuvo con las ecuaciones descritas en la sección 6.16. La nomenclatura de cada ensayo corresponde con la Figura 7-21.

DC: Dicroísmo circular; Fluo: Fluorescencia

ΔG : energía libre de Gibbs; A: dependencia de la energía libre de Gibbs de la concentración de agente desnaturalizante; C_m : concentración de desnaturalizante necesaria para que el 50% de la población analizada se encuentre desplegada; n-i: nativo-intermediario; i-u: intermediario-desplegado.

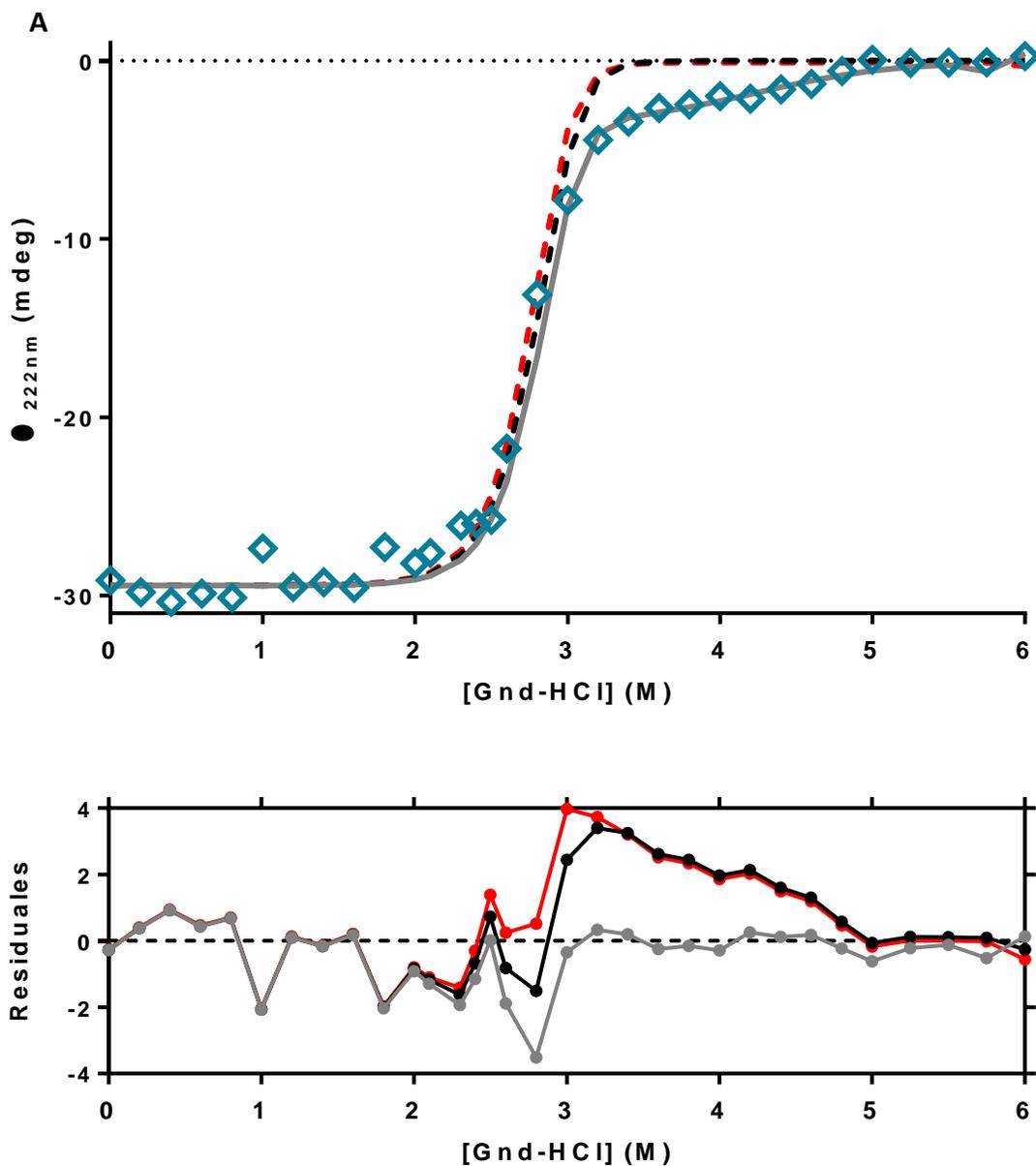


Figura 7-21A. Curva de desplegamiento de *PaCIF* con cloruro de guanidinio (DC 0.3 mg/ml)

Detección de estructura secundaria por dicroísmo circular con una concentración de proteína de 0.3 mg/ml. Los rombos azules corresponden a los datos experimentales. La línea punteada roja muestra el ajuste de dos estados. La línea punteada negra el ajuste de tres estados correspondiente al modelo $N_2 \leftrightarrow I_2 \leftrightarrow 2U$. La línea sólida gris el ajuste de tres estados correspondiente al modelo $N_2 \leftrightarrow 2I \leftrightarrow 2U$. En el gráfico de residuales se muestra la diferencia de los datos teóricos con respecto a los experimentales. La representación de cada modelo se mantiene con los colores antes descritos.

Θ_{222nm} : elipticidad molar a 222 nm.

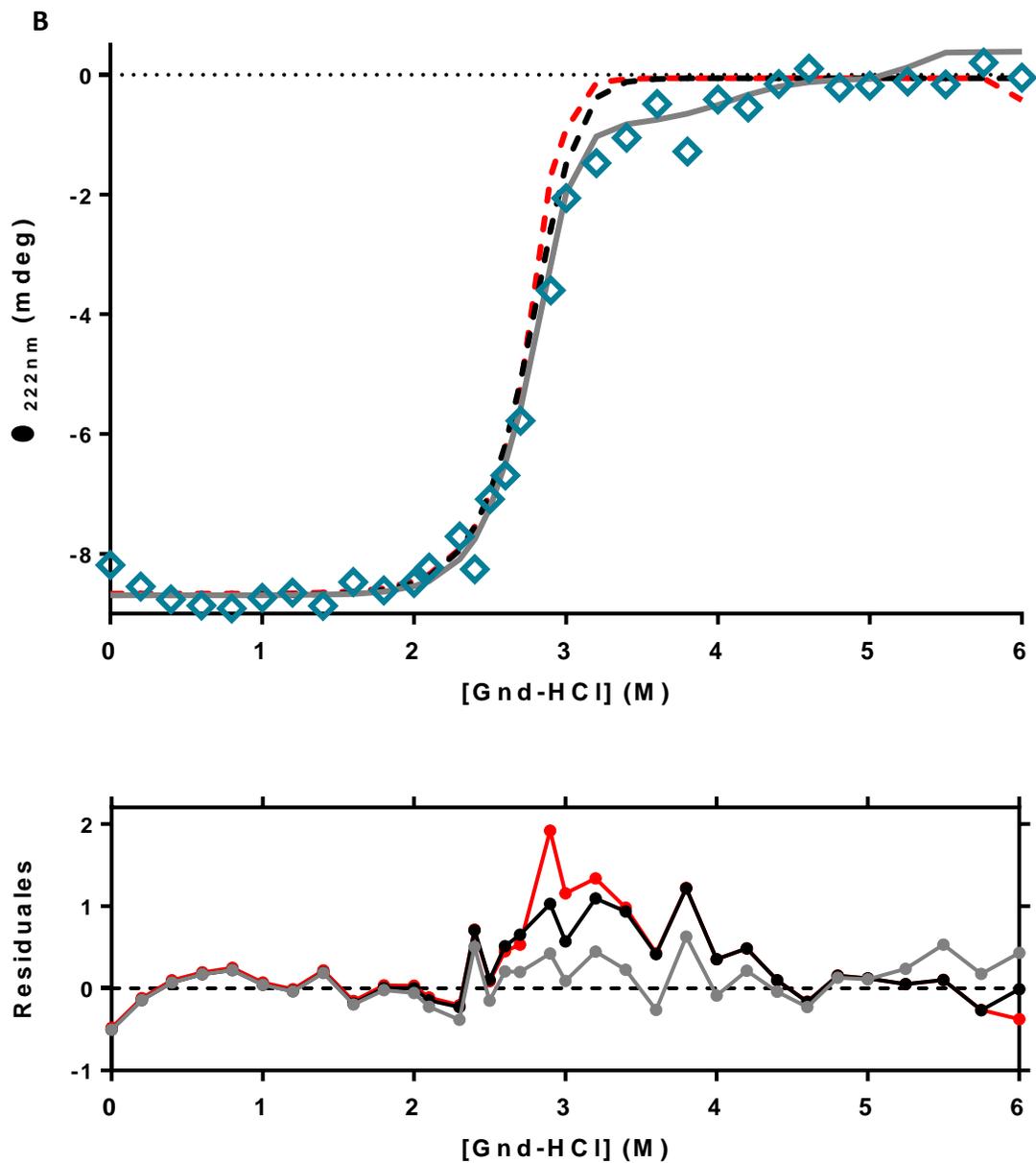


Figura 7-21B. Curva de desplegamiento de *PaCIF* con cloruro de guanidinio (DC 0.1 mg/ml).

Detección de estructura secundaria por dicroísmo circular con una concentración de proteína de 0.1 mg/ml. Los rombos azules corresponden a los datos experimentales. La línea punteada roja muestra el ajuste de dos estados. La línea punteada negra el ajuste de tres estados correspondiente al modelo $N_2 \leftrightarrow I_2 \leftrightarrow 2U$. La línea sólida gris el ajuste de tres estados correspondiente al modelo $N_2 \leftrightarrow 2I_1 \leftrightarrow 2U$. En el gráfico de residuales se muestra la diferencia de los datos teóricos con respecto a los experimentales. La representación de cada modelo se mantiene con los colores antes descritos.

Θ_{222nm} : elipticidad molar a 222 nm.

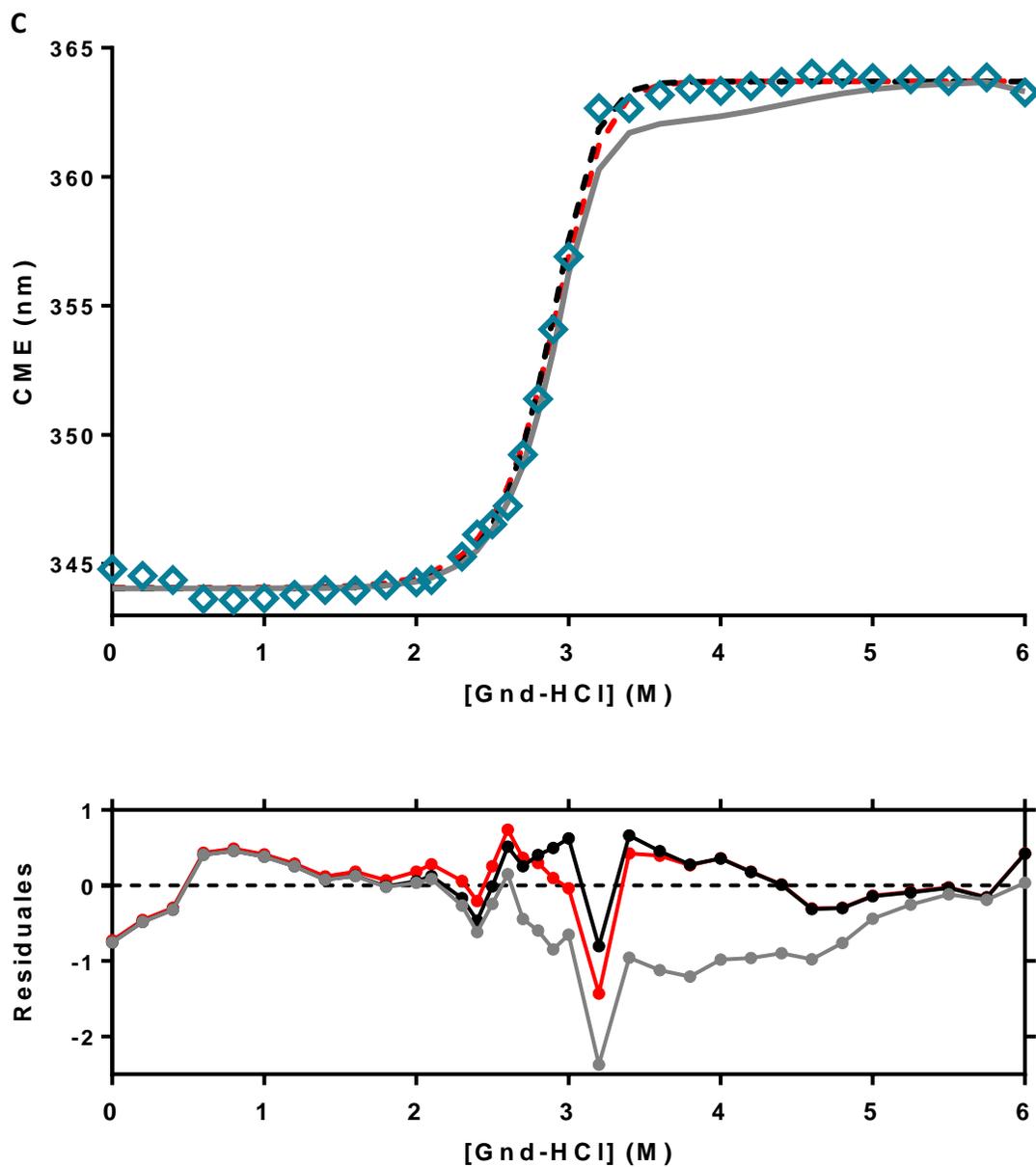


Figura 7-21C. Curva de desplegamiento de *PaCIF* con cloruro de guanidinio (Fluo 0.1 mg/ml).

Detección de estructura tridimensional por fluorescencia intrínseca de triptófanos con una concentración de proteína de 0.1 mg/ml. Los rombos azules corresponden a los datos experimentales. La línea punteada roja muestra el ajuste de dos estados. La línea punteada negra el ajuste de tres estados correspondiente al modelo $N_2 \leftrightarrow I_2 \leftrightarrow 2U$. La línea sólida gris el ajuste de tres estados correspondiente al modelo $N_2 \leftrightarrow 2I \leftrightarrow 2U$. En el gráfico de residuales se muestra la diferencia de los datos teóricos con respecto a los experimentales. La representación de cada modelo se mantiene con los colores antes descritos.

CME: centro de masas espectral.

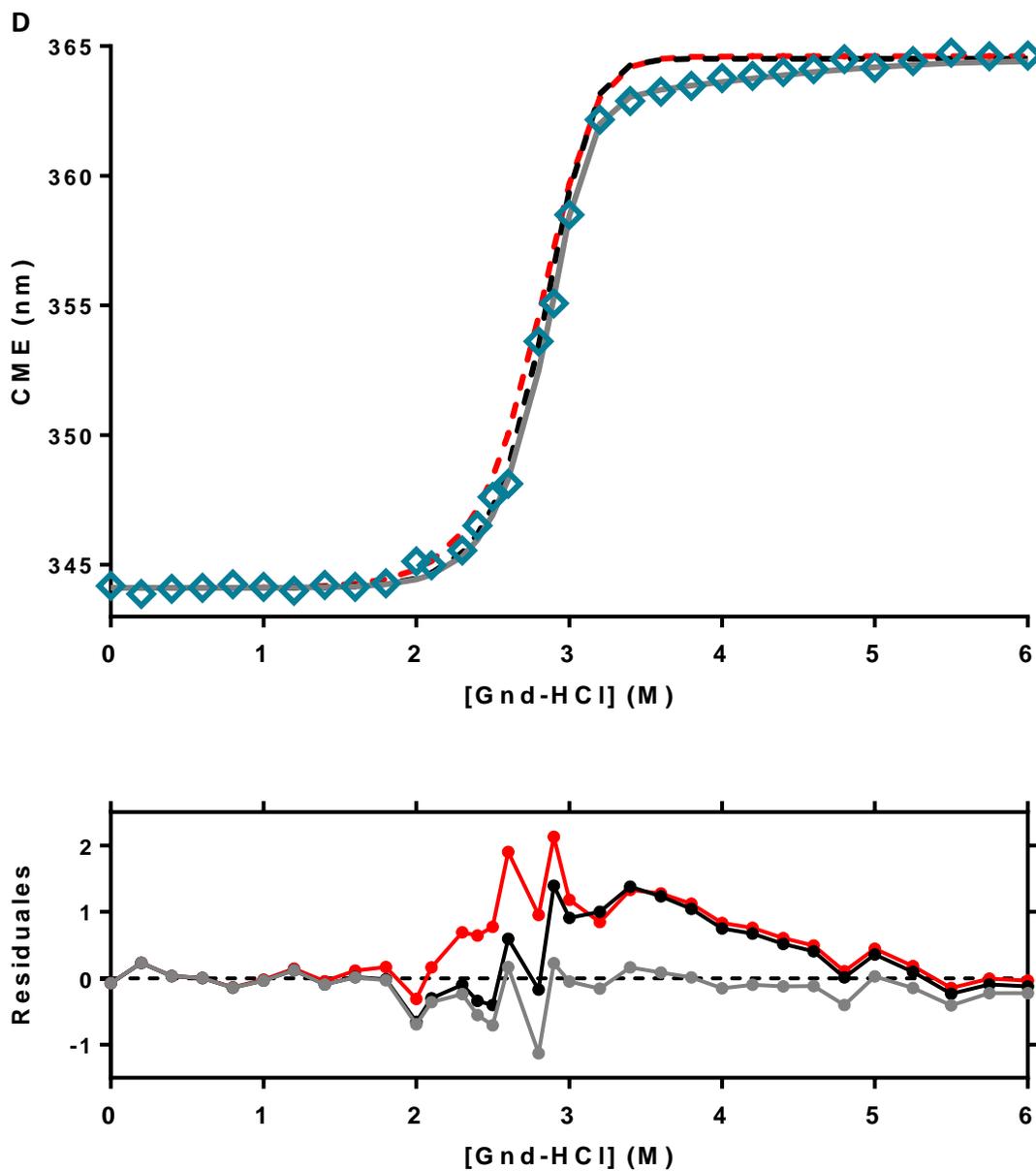


Figura 7-21D. Curva de desplegamiento de *PaCIF* con cloruro de guanidinio (Fluo 0.05 mg/ml).

Detección de estructura tridimensional por fluorescencia intrínseca de triptófanos con una concentración de proteína de 0.05 mg/ml. Los rombos azules corresponden a los datos experimentales. La línea punteada roja muestra el ajuste de dos estados. La línea punteada negra el ajuste de tres estados correspondiente al modelo $N_2 \leftrightarrow I_2 \leftrightarrow 2U$. La línea sólida gris el ajuste de tres estados correspondiente al modelo $N_2 \leftrightarrow 2I \leftrightarrow 2U$. En el gráfico de residuales se muestra la diferencia de los datos teóricos con respecto a los experimentales. La representación de cada modelo se mantiene con los colores antes descritos.

CME: centro de masas espectral.

Figura 7-21. Curva de desplegamiento de *PaCIF* con cloruro de guanidinio

Los datos obtenidos con dicroísmo circular y fluorescencia intrínseca de triptófanos (Figura 7-21), se convirtieron en fracción aparente de proteína desplegada para poder agruparlos en una sola gráfica y así compararlos (Figura 7-22). Se comprueba que el perfil de desplegamiento entre proteína nativa e intermediario sigue el mismo comportamiento, permitiendo determinar que la concentración a la cual tenemos el 50% de proteína desplegada es de 2.85 ± 0.05 M cloruro de guanidinio (Tabla 7-3). Mientras que se tiene una concentración media de 4.2 ± 0.2 M de cloruro de guanidinio para desnaturalizar el 50% del intermediario. Por ello es necesario utilizar concentraciones por arriba de 4 M de cloruro de guanidinio para asegurar que se tiene la forma monomérica de la proteína.

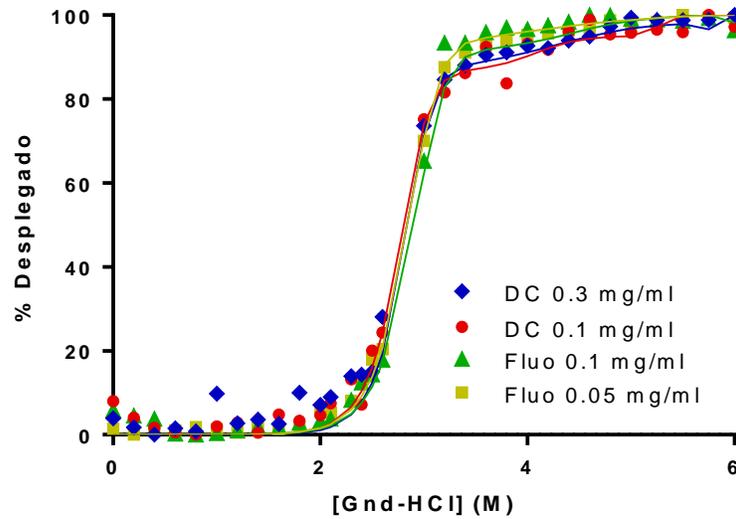


Figura 7-22. Curvas de desplegamiento con cloruro de guanidinio de PaCIF

Detección de estructura secundaria (rombos azules: DC 0.3 mg/ml y círculos rojos: DC 0.1 mg/ml) por dicroísmo circular y de estructura terciaria (triángulos verdes: Fluo 0.1mg/ml y cuadrados amarillos: Fluo 0.05mg/ml) por fluorescencia variando la concentración de proteína en cada ensayo. Las figuras sólidas corresponden a los datos experimentales. La línea es el ajuste de datos al modelo $N_2 \leftrightarrow 2I \leftrightarrow 2U$ descrito en la sección 6.16.

Una vez demostrado el efecto del cloruro de guanidinio sobre la estructura de la proteína, se evaluó el efecto sobre la actividad enzimática. Para ello se analizó la actividad residual de la enzima. En la Figura 7-23 se muestran los resultados obtenidos después de incubar por 1, 2 y 5 horas la enzima con distintas concentraciones de cloruro de guanidinio a 25 °C. Al ser un agente caotrópico más fuerte que la urea, se puede observar que requiere tiempos de incubación más cortos, a las 5 horas la proteína perdió

actividad por completo al utilizar 6 M de Gnd-HCl, indicando su desnaturalización. Esto concuerda con los datos estructurales, que como ya se mencionó, se requieren concentraciones por arriba de 4 M para asegurar la disociación del dímero. Con todos estos resultados se establecieron como condiciones de desplegamiento: 5 horas de incubación a 25 °C con 6 M Gnd-HCl. Estas condiciones permiten la pérdida de estructura y función de la enzima, así como la disociación del dímero, mostrando que la proteína tiene un proceso de desnaturalización adecuado para los fines del proyecto global.

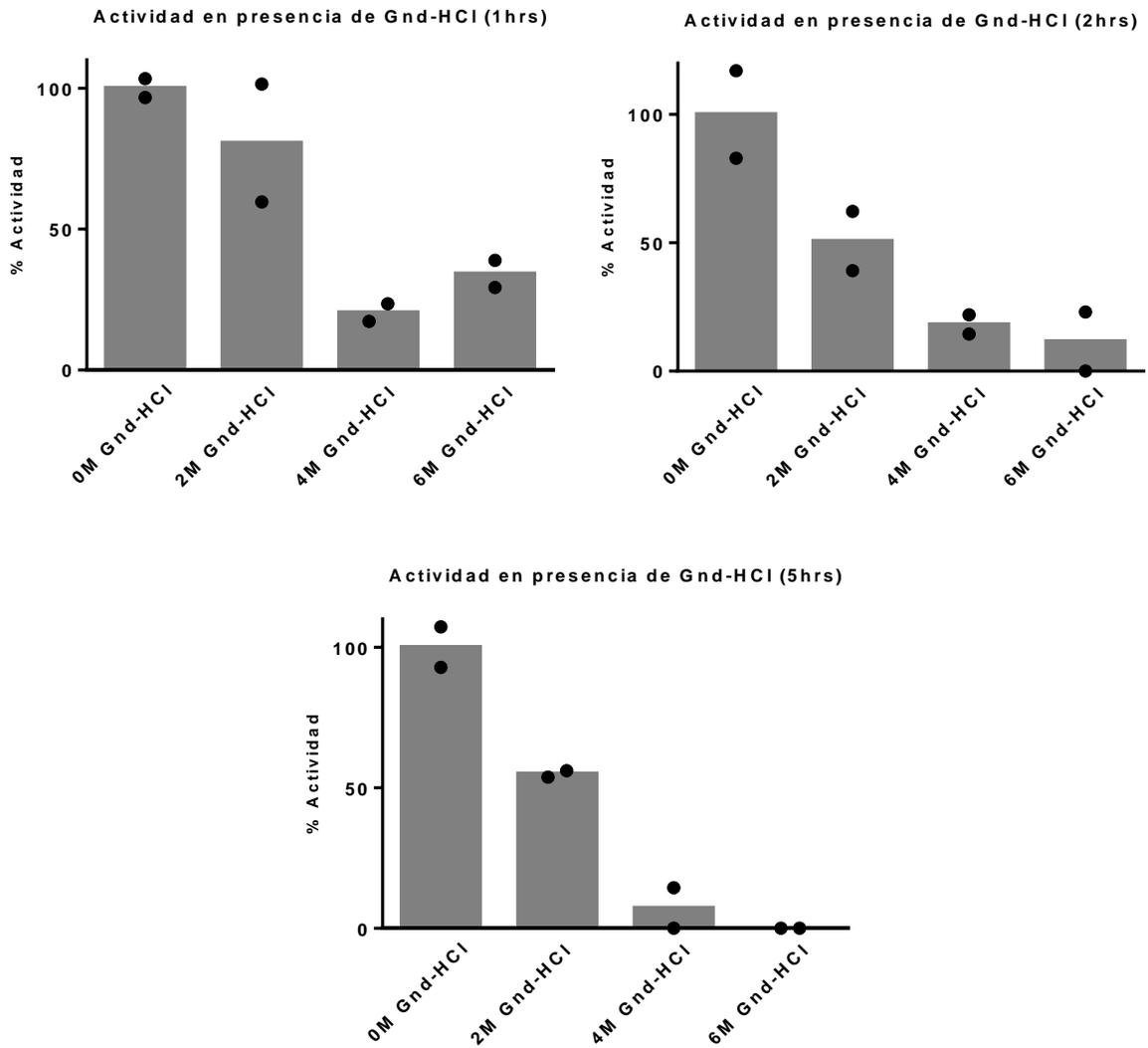


Figura 7-23. Desplegamiento con cloruro de guanidinio de *PaCIF*

Ensayo de actividad residual mediante la hidrólisis de epibromohidrina. Los puntos representan los datos experimentales, la barra gris muestra el promedio de estos datos. El ensayo se hizo por duplicado.

Después de obtener el perfil de desplegamiento se buscó replegar la enzima. Se probaron varios tratamientos de los cuales todos consistían en la dilución del agente caotrópico; sin embargo, la enzima no es capaz de tolerar cambios drásticos en la solución que la contiene y precipita. Por ello se utilizaron distintos agentes que facilitan el replegamiento mediante un aumento en la viscosidad del medio, como Tween 20 y glicerol, sin lograr recuperar la actividad enzimática. Posteriormente se probó con L-arginina, este aminoácido ha sido utilizado previamente para el replegamiento de proteínas [Reddy *et al.*, 2005]. El mecanismo por el cual evita la agregación no ha sido esclarecido, pero se ha visto que aumenta la tensión superficial del agua y se une a residuos aromáticos de la proteína desplazando al cloruro de guanidinio y favoreciendo la solubilidad y replegamiento de la proteína [Shukla *et al.*, 2010]. Añadiendo 0.9 M de L-arginina en la solución utilizada para diluir el agente desnaturante, observamos una recuperación de más del 50% de actividad epóxido hidrolasa. En la Figura 7-24 se muestra la dependencia del replegamiento de la enzima de L-arginina, alcanzando cerca del 60% de actividad con respecto a la nativa cuando se utiliza 1.3 M de arginina. Concentraciones por encima de esto, causan el efecto contrario al deseado, inhibiendo la actividad enzimática y/o el replegamiento.

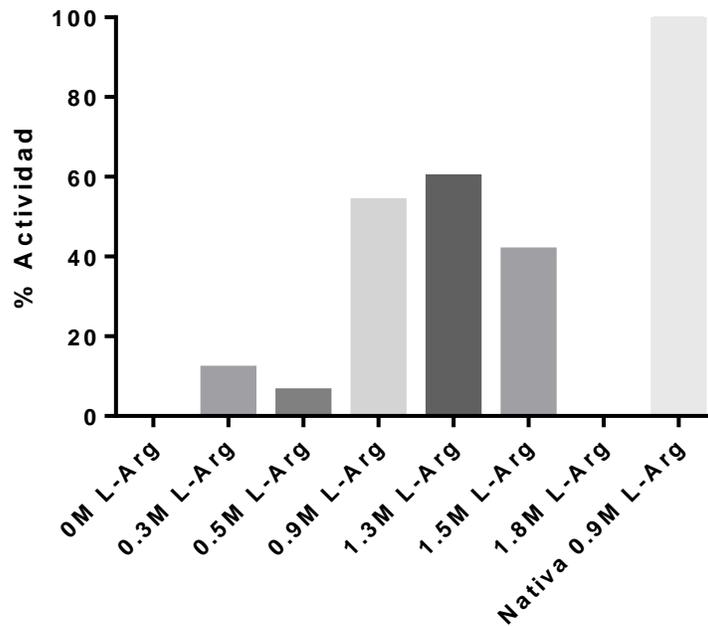


Figura 7-24. Perfil de replegamiento de PaCIF con L-arginina

Ensayo de actividad enzimática mediante la hidrólisis de epibromohidrina.

7.7. Caracterización cinética de PaCIF

Como se describió en la sección de Métodos, la enzima es capaz de catalizar la ruptura de epóxidos, por lo que se utiliza epibromohidrina como sustrato de la reacción. El producto de esta reacción es 3-bromo-1,2-propanodiol, el cual no tiene una propiedad espectroscópica que podamos seguir, por lo que para detectar esta reacción es necesario llevar a cabo un ensayo indirecto, en el que se mide el peryodato remanente en forma de adenocromo formado por la oxidación de la epinefrina. El peryodato es capaz de reaccionar con el diol por ello podemos utilizarlo como indicador de

ausencia-presencia del diol. Para cuantificar la cantidad de 3-bromo-1,2-propanodiol se requiere una curva estándar con este reactivo. Se probaron distintas condiciones para que el experimento sea reproducible y permita la medición de lo que se está produciendo. La curva se estandarizó en un intervalo de concentraciones desde 0 hasta 2.7 mM. La linealidad de la curva expresada como el coeficiente de correlación lineal se encuentra entre 0.96 y 0.98 (Figura 7-25).

Una vez estandarizada la curva se procedió a analizar la actividad enzimática. La primera prueba era determinar la concentración de enzima necesaria para obtener concentraciones adecuadas de 3-bromo-1,2-propanodiol, para ello se utilizaron 0, 10, 25, 40, 60 y 75 μg de proteína purificada y 10 mM de epibromohidrina. En todos los casos la concentración del producto caía dentro de la curva, siendo 25 μg de proteína lo más conveniente para analizar el comportamiento de la enzima a diferentes concentraciones de sustrato. En la Figura 7-26 se puede observar que concentraciones por arriba de 20 mM de epibromohidrina consiguen saturar los 25 μg de enzima en 30 minutos, este ensayo se llevó a cabo en 30 minutos con una medición a punto final.

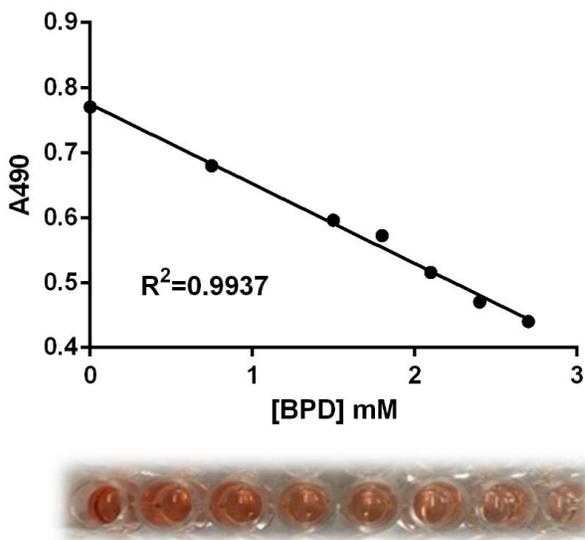


Figura 7-25. Curva estándar de 0-2.7 mM 3-bromo-1,2-propanodiol

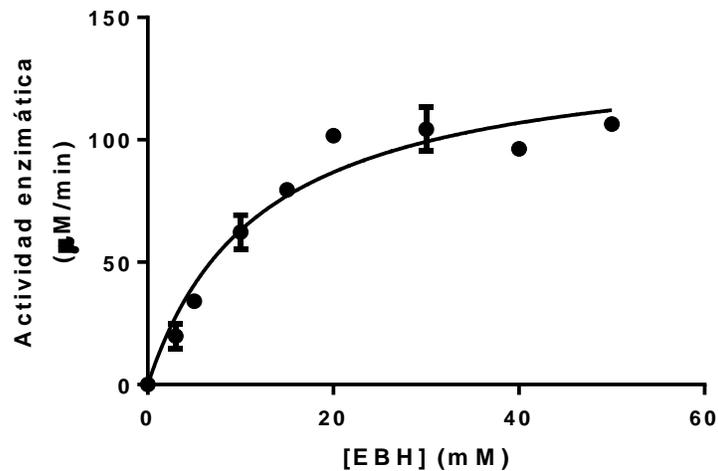


Figura 7-26. Análisis de la actividad enzimática de *PaCIF* variando la concentración de sustrato

La reacción se llevó a cabo en 30 minutos

Para determinar las velocidades iniciales se utilizaron concentraciones de epibromohidrina de 0 a 90 mM, 20 µg de enzima en un intervalo de temperatura de 15°C a 41°C y los tiempos analizados variaron entre 0 y 20 minutos. Con las condiciones establecidas se procedió a determinar los parámetros catalíticos, para lo cual se realizó un ajuste a la ecuación de Michaelis-Menten con los datos de velocidad inicial obtenidos a diferentes concentraciones de sustrato (Figura 7-27). Con estos valores se determinaron las constantes cinéticas (Tabla 7-4). Al ser un ensayo enzimático que requiere una serie de pasos para lograr la cuantificación del producto, se vuelve poco sensible impidiendo obtener valores muy precisos a bajas concentraciones de sustrato y periodos muy cortos de tiempo, por ello se observa una alta variabilidad en puntos a bajas concentraciones de sustrato. Cabe mencionar, que previo a estos ensayos se analizó el comportamiento enzimático con respecto al tiempo (datos no mostrados). Evidenciando que por arriba de 20 minutos la enzima alcanza la máxima formación de producto, por lo que, analizar la actividad enzimática después de 20 minutos impide la determinación de la velocidad inicial de reacción. El análisis de los datos obtenidos permite estimar que el valor de K_M se encuentra entre 6 y 15 mM para epibromohidrina sin mostrar alguna tendencia conforme varía la temperatura. En cambio, la k_{cat} muestra una dependencia de la temperatura, mostrando el valor máximo a 37 °C. Dichas constantes permitieron calcular la eficiencia catalítica, la cual es muy baja para epibromohidrina, que al no ser el sustrato natural cobra sentido.

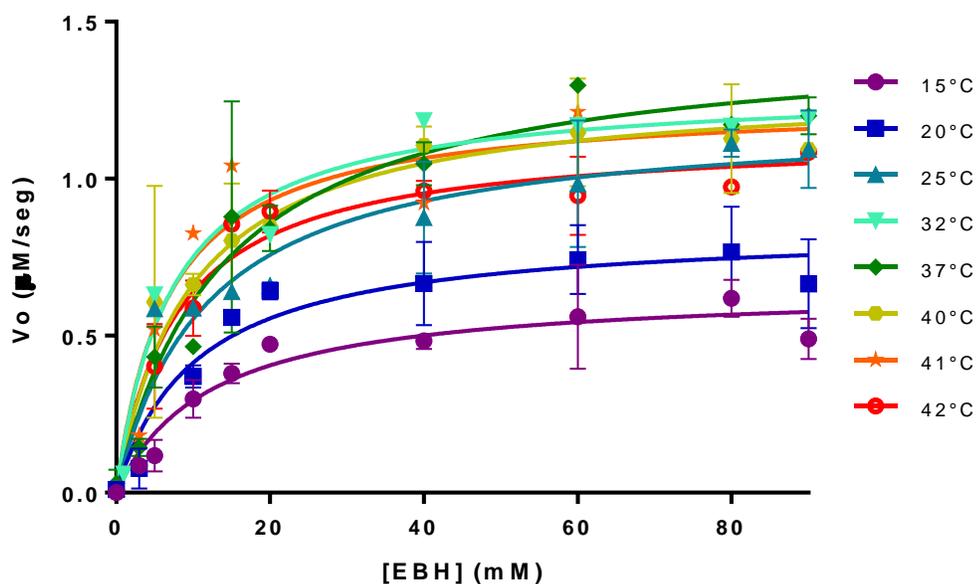


Figura 7-27. Ajuste Michaelis-Menten de *PaCIF* a diversas temperaturas

El sustrato utilizado fue epibromohidrina. A excepción de las curvas a 32°C y 41°C, los experimentos se hicieron por duplicado.

Temperatura	K_M ($\times 10^{-3}M$)	V_{max} ($\mu M s^{-1}$)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_M ($s^{-1} M^{-1}$)
15°C	12.4 ± 4.1	0.66 ± 0.11	0.22 ± 0.04	18.1 ± 3.0
20°C	8.9 ± 3.2	0.83 ± 0.11	0.28 ± 0.04	32.7 ± 7.5
25°C	10.8 ± 5.0	1.23 ± 0.12	0.41 ± 0.04	41.5 ± 15.5
32°C	7.2 *	1.29 *	0.43 *	59.6 *
37°C	14.4 ± 6.7	1.47 ± 0.07	0.49 ± 0.02	37.8 ± 16.1
40°C	9.5 ± 2.7	1.29 ± 0.06	0.43 ± 0.02	47.3 ± 15.7
41°C	6.8 *	1.25 *	0.42 *	61.5 *
42°C	8.2 ± 2.2	1.18 ± 0.05	0.38 ± 0.02	50.2 ± 15.5

Tabla 7-4. Parámetros catalíticos de *PaCIF* a diversas temperaturas

Datos obtenidos con GraphPad Prism 6.0 a partir de los datos de la Figura 7-27.

* Datos de un solo experimento.

7.8. Caracterización de la actividad enzimática con respecto a la temperatura

Con los datos cinéticos obtenidos a diversas temperaturas (Figura 7-27 y Tabla 7-4), se analizó el comportamiento de k_{cat} al variar la temperatura (Figura 7-28). Encontrando que la proteína sigue el comportamiento descrito por Arrhenius en las temperaturas por debajo de la T_{opt} . Posterior a la temperatura óptima comienza a caer la actividad enzimática, lo que tradicionalmente se le atribuye al proceso de desnaturalización de la proteína. Sin embargo, si se compara con el perfil de desplegamiento térmico obtenido por dicroísmo circular esto no puede ser del todo explicado ya que como se observa en la Figura 7-28, la T_m de la enzima es de $60.6\text{ }^{\circ}\text{C}$ (333.75 K) mostrando ligeros cambios estructurales a partir de $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ (303.15 K). Esta caída de actividad podría atribuirse a que estos cambios estructurales son importantes para la catálisis enzimática, sin embargo, el cambio estructural que presenta la proteína a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ (313.15 K) es el mismo que a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ (310.15 K), que es donde se encontró el valor más alto de k_{cat} . Con estos datos se puede asumir que el comportamiento de la curva no se debe a un proceso de desnaturalización y permite considerar a la enzima epóxido hidrolasa de *P. aeruginosa* como buen modelo para analizar el efecto de la capacidad calorífica en la catálisis enzimática.

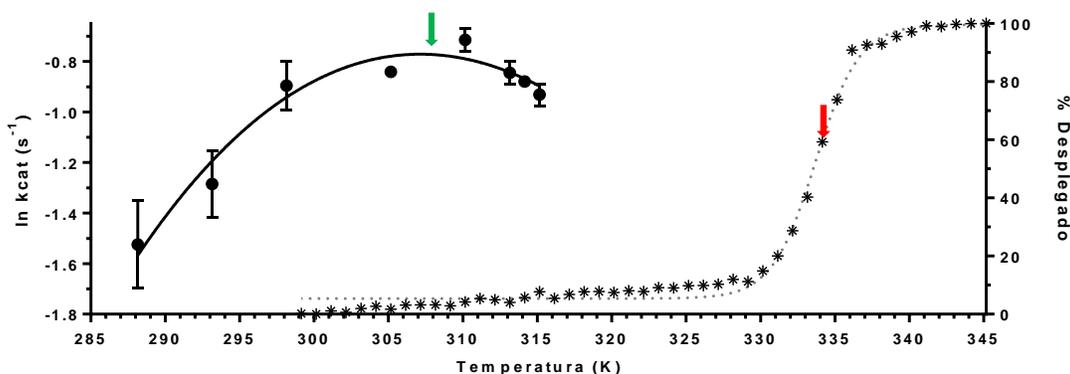


Figura 7-28. Efecto de la temperatura en la catálisis enzimática y en la estructura secundaria de PaCIF

El gráfico que corresponde a la actividad enzimática (izquierda) se obtuvo a partir de los datos cinéticos mostrados en la tabla 7-4, los datos fueron ajustados a la ecuación 3. La flecha verde indica la T_{op} obtenida con la ecuación 4. El gráfico que representa la desnaturalización térmica (derecha) se obtuvo al analizar la elipticidad molar a 222 nm con respecto al incremento de temperatura, los datos fueron normalizados con respecto al porcentaje de proteína desplegada. Los asteriscos muestran los valores experimentales y la línea punteada el ajuste sigmoideo de Boltzmann. La flecha roja indica la T_m obtenida mediante el mismo ajuste.

Los datos experimentales se ajustaron a la ecuación de la teoría de la velocidad macromolecular:

$$\ln(k) = \ln\left(\frac{k_B T}{h}\right) - \frac{[\Delta H_{T_0}^\ddagger + \Delta C_p^\ddagger (T - T_0)]}{RT} + \frac{[\Delta S_{T_0}^\ddagger + \Delta C_p^\ddagger \ln(T/T_0)]}{R} \quad (eq\ 3)$$

En donde, mediante una serie de iteraciones se obtuvieron los parámetros termodinámicos mostrados en la tabla 7-5. Para obtener estos datos la ecuación requiere una temperatura de referencia (T_0), se utilizó 298.15 K que corresponde a las condiciones estándar. El ΔC_p^\ddagger calculado es de -3.2 ± 0.6 kJ mol⁻¹ K⁻¹, lo cual coincide con lo previamente reportado [Arcus et al., 2016], en donde encuentran que el intervalo de ΔC_p^\ddagger en reacciones catalizadas enzimáticamente es de -1 kJ mol⁻¹ K⁻¹ hasta -12 kJ mol⁻¹ K⁻¹. La temperatura óptima de reacción es de 307.2 ± 0.8 K, esto se pudo determinar con los datos de la tabla 7-5 y la siguiente ecuación:

$$T_{opt} = \frac{\Delta H_{T_0}^\ddagger - \Delta C_p^\ddagger T_0}{-\Delta C_p^\ddagger - R} \quad (eq\ 4)$$

T_0 K	$\Delta H_{T_0}^\ddagger$ kJ mol ⁻¹	$\Delta S_{T_0}^\ddagger$ kJ mol ⁻¹ K ⁻¹	ΔC_p^\ddagger kJ mol ⁻¹ K ⁻¹	T_{opt} K
298.15	26.1 ± 3.0	-0.17 ± 0.01	-3.2 ± 0.6	307.2 ± 0.8

Tabla 7-5. Parámetros termodinámicos de PaCIF

Datos obtenidos con GraphPad Prism 6.0 a partir de los datos de la Figura 7-27 y las ecuaciones 3 y 4.

7.9. Construcción de pET28-PaCIF-MBP

Al resolver que la epóxido hidrolasa de *P. aeruginosa* cuenta con las características adecuadas para su uso como modelo en el análisis del efecto de la capacidad calorífica en la catálisis enzimática, se procedió a generar las construcciones que serán necesarias para la formación del heterodímero. Como se mencionó antes, una vez que se tenga la mezcla de los diferentes dímeros (AA, BB y AB) es necesario aislar AB. Para ello se utilizarán dos etiquetas moleculares distintas y se procederá a dos procesos de purificación por afinidad. La subunidad A (silvestre) presentará una proteína de unión a maltosa (MBP) y la subunidad B (catalíticamente inactiva, expresada con isótopos pesados) tendrá una cola de 6 histidinas. Una vez obtenida la mezcla (AA, BB y AB), será purificada por afinidad a maltosa; la

proteína eluida contendrá una mezcla de AA y AB, ya que el homodímero BB no tendrá la capacidad de unirse a la resina. Posteriormente, la mezcla AA y AB se purificará por afinidad a níquel; el homodímero AA será incapaz de unirse a la resina ya que no presenta afinidad a ella, dejando así solo el heterodímero AB.

El plásmido que contiene el gen de epóxido hidrolasa presenta muchas dificultades para la eliminación de la cola de histidinas y la inserción de la proteína de unión a maltosa. Además, la β -lactamasa es una enzima secretable por lo que compite con epóxido hidrolasa por la vía de secreción, disminuyendo la cantidad de enzima de interés secretada. Por ello se decidió cambiar de vector a un pET28. Este plásmido contiene un gen que codifica para aminoglucósido fosfotransferasa, enzima que confiere resistencia a kanamicina mediante la incorporación de un fosfato a la molécula afectando la capacidad de inhibir la síntesis proteica, enzima que actúa a nivel intracelular. Para llevar a cabo esta construcción se diseñaron los oligonucleótidos previamente descritos en la tabla 6-1.

Al ser una secuencia muy larga la que se tiene que adicionar en el extremo N-terminal de *PaCif* se diseñaron dos oligonucleótidos sentido para lograr introducir toda la información. Por lo que se realizaron dos rondas de PCR para obtener el fragmento deseado (Figura 7-29 y 7-31) Con este diseño se obtuvo un fragmento de 1055 pb que contiene un sitio de reconocimiento para la endonucleasa *NcoI*, un sitio de unión a ribosoma con la distancia adecuada antes del ATG, la secuencia codificante para *PaCif*, con un sitio de reconocimiento para la proteasa TEV, finalizando con los sitios de reconocimiento a las endonucleasas *SacI* y *NotI*. Los diversos sitios de restricción incorporados son estrategias para pasos posteriores en la construcción del vector, el sitio de reconocimiento a TEV es para eliminar la etiqueta molecular del carboxilo terminal de la proteína después de su purificación.

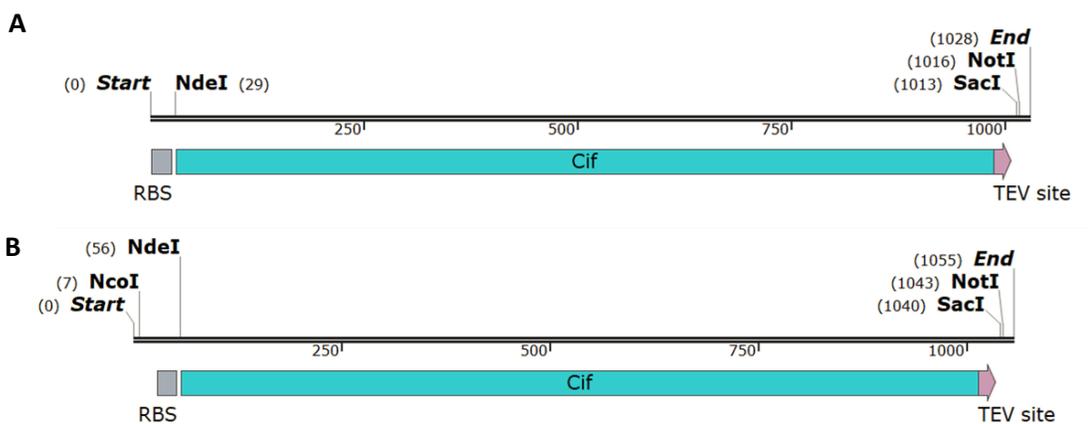


Figura 7-29. Representación de los distintos productos de PCR para el gen de *PaCif*

(A) Producto de PCR obtenido con los oligonucleótidos RBSCif_FW1 y NSTevCif_RV. (B) Producto de PCR obtenido con los oligonucleótidos NRBSCif_FW2 y NSTevCif_RV

La secuencia codificante para la proteína de unión a maltosa (MBP) se obtuvo del plásmido pET MBP mOrange LIC con los oligonucleótidos enlistados en la tabla 6-1. El producto final de esta amplificación se muestra en la Figura 7-30 y 7-31. Es una secuencia de 1154 pb que consta de un sitio de reconocimiento a la endonucleasa *SacI*, seguido de un conector que codifica para 8 residuos de aminoácidos (ATLLYKVV); esta secuencia ha sido previamente utilizada para fusión de proteínas en el C-terminal. Seguido del conector se encuentra el gen que codifica para la proteína de unión a maltosa con un codón de paro y finalizando con un sitio de reconocimiento a la endonucleasa *NotI*. La incorporación del conector de 8 aminoácidos entre la proteína de interés y la MBP ha mostrado incrementar la solubilidad de otras proteínas fusionadas a MBP [Raran-Kurussi et al., 2015];

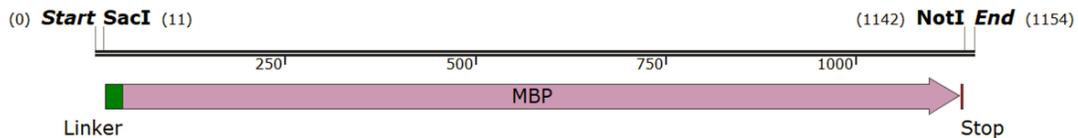


Figura 7-30. Representación del producto de PCR del gen de MBP

Como se puede observar en la Figura 7-31, se obtuvieron los fragmentos de peso esperado correspondientes a *PaCIF* y MBP con sus respectivos accesorios. La imagen de la izquierda muestra la primera ronda de PCR de *PaCIF* y la amplificación de MBP con sus respectivos controles negativos, en ambos casos se muestra una buena amplificación que corresponde al peso esperado, para *PaCIF* se espera un producto de 1028 pb y para MBP 1142 pb. Los productos de PCR se purificaron de las bandas correspondientes para continuar con la construcción. La imagen de la derecha es el resultado de la segunda ronda de PCR para *PaCIF* junto a su control negativo, en este caso se utilizó como templado el producto de PCR purificado de la ronda anterior, esperando un producto de 1055 pb. Finalmente se realizaron las respectivas digestiones con las endonucleasas *NcoI*, *SacI* y *NotI* para ligar los componentes e introducir los productos de amplificación al vector pET28, generando un plásmido con la información organizada como se muestra en la Figura 7-32.

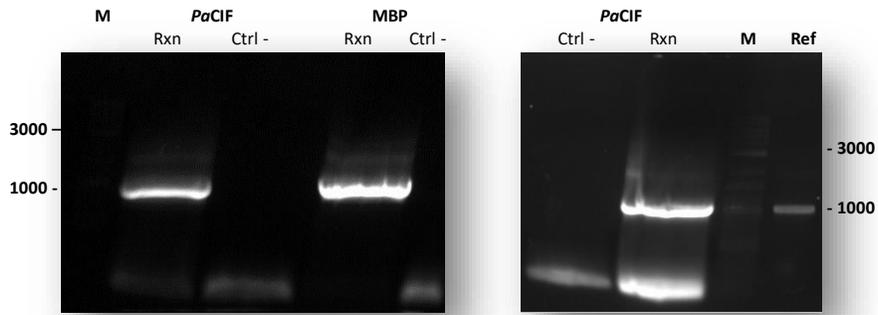


Figura 7-31. Análisis del producto de PCR de *PaCIF* y MBP

Gel de agarosa al 1%, teñido con BrEt. M: Marcador de pesos moleculares. Rxn: Reacción. Ctrl -: Control negativo de la amplificación, (todos los componentes a excepción del molde). Ref: pPCR ronda 1 (1028 pb)

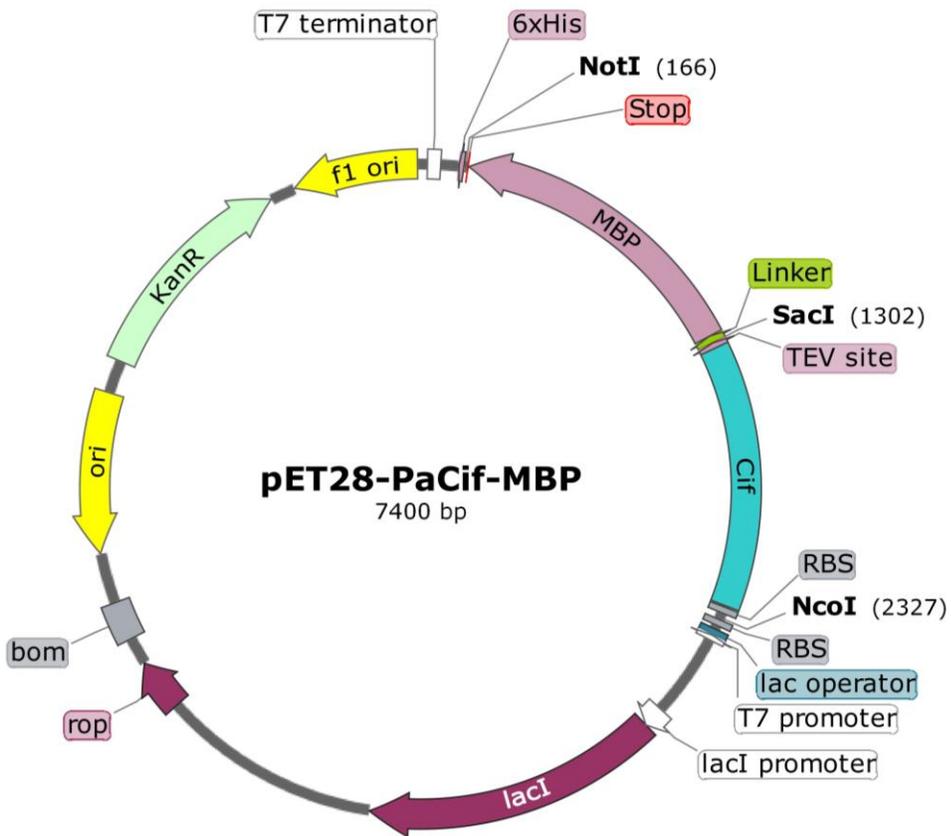


Figura 7-32. Representación esquemática del plásmido pET28-*PaCif*-MBP

El plásmido pET28-*PaCif*-MBP se introdujo por choque térmico a células Ca^{2+} competentes de la cepa MC1061 de *E. coli* para su replicación y mantenimiento. Posteriormente se cultivó en medio LB sólido suplementado con kanamicina, se seleccionaron 2 UFC y se cultivaron en medio LB líquido suplementado con kanamicina. Con la finalidad de comprobar que se tratara del plásmido ilustrado en la Figura 7-33, se hizo un ensayo de digestión a partir de plásmido purificado de ambas clonas. Para esto se utilizó la endonucleasa EcoRI como digestión sencilla, NotI-NcoI y EcoRI-SacI para digestiones dobles. Los resultados se muestran en la Figura 7-33, en la cual se observa el patrón de digestión esperado: 7400 pb correspondientes a plásmido linealizado por la digestión sencilla; 2161 pb y 5239 pb correspondientes al fragmento que contiene los genes de *PaCif*-MBP y el resto del plásmido que genera la doble digestión con NcoI y NotI; 896 pb y 6504 pb fragmentos que son generados por la doble digestión con EcoRI y SacI. Al obtener el patrón esperado se mandó a secuenciar el plásmido obteniendo la secuencia tal como se planeó de acuerdo con el esquema de la Figura 7-32.

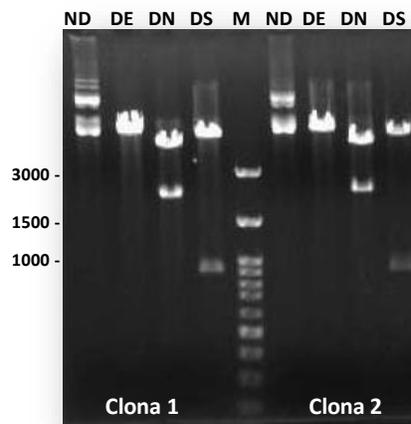


Figura 7-33. Análisis molecular del plásmido pET28-*PaCif*-MBP

ND: No digestión; DE: Digestión sencilla con EcoRI; DN: Doble digestión con NotI y NcoI; DS: Digestión doble con EcoRI y SacI; M: Marcador de pesos moleculares

7.10. Construcción de pDPM73-*PaCif*-D129S-6His

La variante catalíticamente inactiva se obtuvo a partir del producto de PCR anterior. Para amplificar la secuencia que funciona como megaprimer se utilizaron los oligonucleótidos *PaCif*_Mut y NRBS*Cif*_FW2 mostrados en la tabla 6-1. Los resultados obtenidos se ilustran en la Figura 7-34 A, en la cual se observa el producto de la reacción y el control negativo. La banda intensa correspondiente a la reacción fue purificada para posteriormente analizarla, como se muestra en la Figura 7-34 B el producto purificado corresponde al tamaño esperado, el cual es de 429 pb.

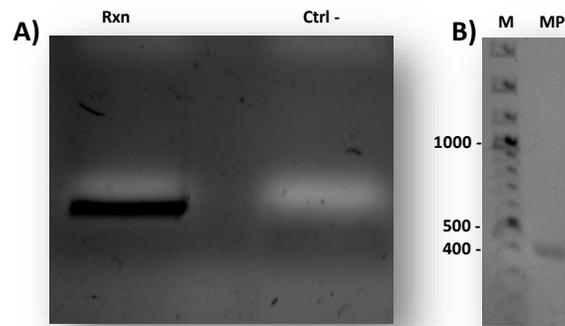


Figura 7-34. Análisis del producto de PCR de megaprimer

A) Producto de PCR con su control negativo. B) Producto de PCR después de su purificación.

Gel de agarosa al 1%, teñido con BrEt. M: Marcador de pesos moleculares. Rxn: Reacción. Ctrl -: Control negativo de la amplificación, (todos los componentes a excepción del molde). MP: Megaprimer mutagénico

Posteriormente se amplificó el gen *PaCIF* con la finalidad de obtener la variante inactiva, para ello se utilizó como molde el producto de PCR de la segunda ronda descrita en la sección 7.9. y como oligonucleótidos el megaprimer obtenido en el paso anterior y NSTevCIF_RV, descrito en la tabla 6-1. El producto esperado es de 1055 pb, en la Figura 7-35 se puede observar el producto de esta amplificación con su control negativo, utilizando como referencia el producto de PCR de la primera ronda (1028 pb). El carril correspondiente a la reacción positiva contiene una banda ligeramente arriba de la banda de referencia lo cual es lo esperado y muestra una banda de mayor peso molecular, pero con menor intensidad. En el carril correspondiente al control negativo se alcanza a apreciar una banda del tamaño esperado; sin embargo, es muy tenue comparada con la intensidad que arroja la banda correspondiente a la reacción. Para continuar con la construcción de la variante inactiva, se purificó la banda que corresponde al tamaño esperado en la reacción de PCR.

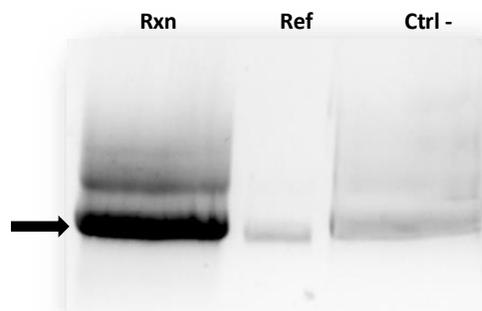


Figura 7-35. Análisis del producto de PCR de *PaCIF* D129S

Gel de agarosa al 1%, teñido con BrEt. Rxn: Reacción. Ctrl -: Control negativo de la amplificación, (todos los componentes a excepción del molde). Ref: Producto de PCR primera ronda, 1028 pb.

Una vez purificado el gen de interés con la mutación se procedió a la digestión con XhoI y EcoRI del producto de PCR y del plásmido pDPM73-*Pa*CIF-6His (Figura 5-1) para su ligación e introducción a células Ca²⁺ competentes de la cepa Top10 de *E. coli* por choque térmico. Las cepas se cultivaron en medio LB sólido suplementado con ampicilina. Se aislaron 3 UFC capaces de crecer en el medio y se cultivaron en medio LB líquido suplementado con ampicilina. Análisis de secuenciación confirman que se trata de la variante D129S de *Pa*CIF y que el gen no contenía ninguna otra mutación espuria.

7.11. Expresión y caracterización de la variante *Pa*CIF D129S

Una vez obtenido el plásmido que codifica a la proteína *Pa*CIF D129S se procedió a los análisis de expresión y purificación de la proteína. esto se logró con la inducción del plásmido pDPM73-*Pa*CIF-D129S-6His en la cepa de *E. coli* Top10 con arabinosa 0.1% por 48 horas y 30°C. La purificación se realizó con el protocolo tradicional de cromatografía de afinidad a Níquel. La Figura 7-36 A muestra un SDS-PAGE con la proteína silvestre y la variante D129S, se puede observar que la proteína tiene el mismo tamaño y patrón de migración. Además, como ya se describió en la sección 7.5., los ensayos de cromatografía por exclusión molecular demostraron que se trata de una proteína con un estado de oligomerización dimérico que presenta un volumen de elución similar al de la versión silvestre. Para determinar la actividad enzimática se utilizó el ensayo de hidrólisis de epibromohidrina con 25 µg de enzima silvestre y enzima inactiva. Los resultados se muestran en la Figura 7-36 B en donde se puede ver que la señal generada por la variante D129S es mínima comparada con la proteína silvestre, demostrando que no tiene actividad enzimática.

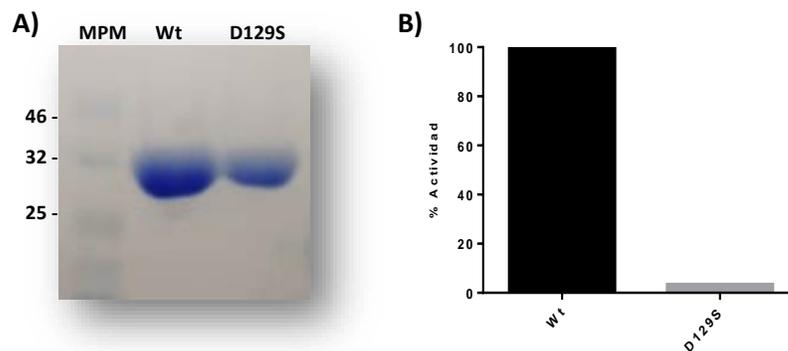


Figura 7-36. Comparativo entre *Pa*CIF silvestre y D129S

A) SDS-PAGE al 12% teñido con azul de Coomassie. B) Ensayo de actividad epóxido hidrolasa.

MPM: Marcador de pesos moleculares; Wt: *Pa*CIF silvestre; D129S: *Pa*CIF con el cambio D129S.

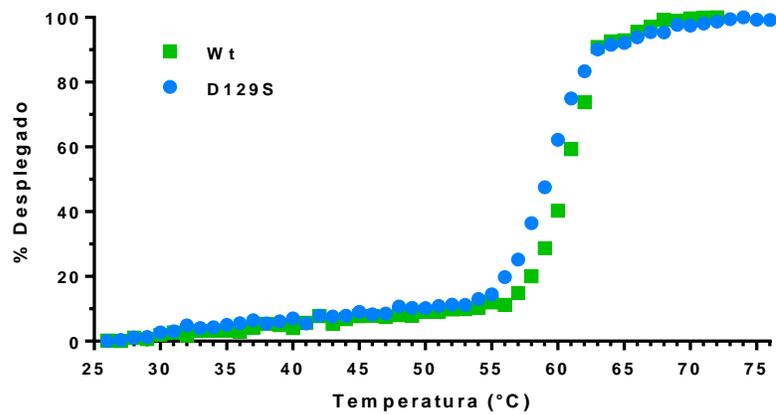


Figura 7-37. Curvas de desnaturalización térmica de PaCIF

Datos obtenidos a partir de difracción circular. El porcentaje de proteína desplegada se obtuvo a partir de la señal a 222nm.

La curva de desplegamiento térmico (Figura 7-37) muestra que la estabilidad de D129S es muy similar a la de la proteína silvestre, arrojando una T_m de 59.2 °C para la variante y 60.6 °C para la proteína silvestre. Los valores difieren de los datos previamente reportados [Bahl et al., 2015], son mayores por 3.6 °C y 3.9 °C para la variante D129S y la proteína silvestre respectivamente.

8. CONCLUSIONES

Después de una elaborada búsqueda bibliográfica, se encontró que la proteína *PaCIF* muestra características deseables para ser propuesta como enzima dimérica que permita estudiar el efecto del ΔC_p^\ddagger sobre la catálisis enzimática. Sin embargo, no existía evidencia del proceso de desnaturalización y replegamiento de la enzima, como tampoco había sido caracterizado el comportamiento cinético con respecto a la temperatura.

Los resultados muestran que se trata de una enzima con una estructura muy estable que requiere altas concentraciones de cloruro de guanidinio para su desnaturalización. Además, tiene un perfil de desplegamiento que presenta un intermediario aparentemente monomérico en etapas finales del proceso. Para lograr el replegamiento se requirió utilizar L-arginina, un agente que favorece el plegamiento, mostrando una recuperación cercana al 50% de actividad.

La caracterización de la actividad enzimática con respecto a la temperatura, muestra que se trata de una enzima cuya actividad se ve disminuida una vez que alcanza su T_{opt} ; lo cual no es atribuible a la desnaturalización de la proteína. Por lo anterior, se puede asumir que, en las condiciones ensayadas, el comportamiento enzimático con respecto a la temperatura se logra describir con la ecuación de la teoría de la velocidad macromolecular. Sin embargo, es necesario ampliar el número de datos experimentales para lograr un mejor ajuste a la ecuación utilizada.

Con los datos anteriores se concluye que la enzima *PaCIF* es un buen modelo de estudio para continuar con el proyecto global, que pretende evaluar el efecto del cambio en la capacidad calorífica sobre la catálisis enzimática.

9. PERSPECTIVAS

- Transformar la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) con el plásmido pET28-*Pa*CIF-MBP para estandarizar las condiciones de expresión y purificación de la fusión *Pa*CIF-MBP.
- Caracterizar el desplegamiento y replegamiento de la proteína fusionada a MBP.
- Encontrar las condiciones adecuadas para permitir la formación de un heterodímero que esté compuesto por una subunidad silvestre fusionada a MBP y por una subunidad catalíticamente inactiva con una etiqueta de 6 histidinas.
- Expresar y purificar la variante D129S en medio mínimo suplementado con isótopos pesados.
- Analizar el comportamiento cinético con respecto a la temperatura del heterodímero en su versión ligera/ligera, así como en la versión ligera/pesada.
- Analizar los datos obtenidos con la ecuación de MMRT y evaluar el efecto en ΔC_p^\ddagger en la catálisis enzimática.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Arcus, V. L., Prentice, E. J., Hobbs, J. K., Mulholland, A. J., Van der Kamp, M. W., Pudney, C. R., Parker, E. J. & Schipper, L. A. (2016). On the temperature dependence of enzyme-catalyzed rates. *Biochemistry*, 55(12), 1681-1688.
- Bahl, C. D., MacEachran, D. P., O'Toole, G. A., & Madden, D. R. (2010a). Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of Cif, a virulence factor secreted by *Pseudomonas aeruginosa*. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, 66(1), 26-28.
- Bahl, C. D., Morisseau, C., Bomberger, J. M., Stanton, B. A., Hammock, B. D., O'Toole, G. A., & Madden, D. R. (2010b). Crystal structure of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator inhibitory factor CIF reveals novel active-site features of an epoxide hydrolase virulence factor. *Journal of Bacteriology*, 192(7), 1785-1795.
- Bahl, C. D., Hvorecny, K. L., Bomberger, J. M., Stanton, B. A., Hammock, B. D., Morisseau, C., & Madden, D. R. (2015). Inhibiting an epoxide hydrolase virulence factor from *Pseudomonas aeruginosa* protects CFTR. *Angewandte Chemie International Edition*, 54(34), 9881-9885.
- Bennet, A. J. (2012). Kinetic isotope effects for studying post-translational modifying enzymes. *Current Opinion in Chemical Biology*, 16(5-6), 472-478.
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., & Stryer, L. (2002). *Biochemistry*, 5th edn, W. H.
- Bertrand, T., Augé, F., Houtmann, J., Rak, A., Vallée, F., Mikol, V., ... & Mathieu, M. (2010). Structural basis for human monoglyceride lipase inhibition. *Journal of Molecular Biology*, 396(3), 663-673.
- Britt, B. M. (1997). For enzymes, bigger is better. *Biophysical chemistry*, 69(1), 63-70.
- Buschiazzo, A., Goytia, M., Schaeffer, F., Degrave, W., Shepard, W., Grégoire, C., ... & Alzari, P. M. (2006). Crystal structure, catalytic mechanism, and mitogenic properties of *Trypanosoma cruzi* proline racemase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(6), 1705-1710.
- Callender, R., & Dyer, R. B. (2014). The dynamical nature of enzymatic catalysis. *Accounts of Chemical Research*, 48(2), 407-413.
- Chamond, N., Grégoire, C., Coatnoan, N., Rougeot, C., Freitas-Junior, L. H., da Silveira, J. F., ... & Minoprio, P. (2003). Biochemical characterization of proline racemases from the human protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* and definition of putative protein signatures. *Journal of Biological Chemistry*, 278(18), 15484-15494.
- Chan, P. W., Yakunin, A. F., Edwards, E. A., & Pai, E. F. (2011). Mapping the reaction coordinates of enzymatic defluorination. *Journal of the American Chemical Society*, 133(19), 7461-7468.
- Dill, K. A., & Chan, H. S. (1997). From Levinthal to pathways to funnels. *Nature Structural Biology*, 4(1), 10-19.
- Dill, K. A., Ozkan, S. B., Shell, M. S., & Weikl, T. R. (2008). The protein folding problem. *Annu. Rev. Biophys.*, 37, 289-316.
- Ernst, O., & Zor, T. (2010). Linearization of the Bradford protein assay. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (38), e1918.

- Garcia-Viloca, M., Gao, J., Karplus, M., & Truhlar, D. G. (2004). How enzymes work: analysis by modern rate theory and computer simulations. *Science*, 303(5655), 186-195.
- Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M.R., Appel R.D., Bairoch A.; Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server; (In) John M. Walker (ed): *The Proteomics Protocols Handbook*, Humana Press (2005). pp. 571-607
- Goldstone, D. C., Villas-Bôas, S. G., Till, M., Kelly, W. J., Attwood, G. T., & Arcus, V. L. (2010). Structural and functional characterization of a promiscuous feruloyl esterase (Est1E) from the rumen bacterium *Butyrivibrio proteoclasticus*. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 78(6), 1457-1469.
- Hobbs, J. K., Jiao, W., Easter, A. D., Parker, E. J., Schipper, L. A., & Arcus, V. L. (2013). Change in heat capacity for enzyme catalysis determines temperature dependence of enzyme catalyzed rates. *ACS Chemical Biology*, 8(11), 2388-2393.
- Jones, H. B., Crean, R. M., Matthews, C., Troya, A. B., Danson, M. J., Bull, S. D., & Pudney, C. R. (2018). Uncovering the Relationship between the Change in Heat Capacity for Enzyme Catalysis and Vibrational Frequency through Isotope Effect Studies. *ACS Catalysis*, 8(6), 5340-5349.
- Kamp, M. W., Prentice, E. J., Kraakman, K. L., Connolly, M., Mulholland, A. J., & Arcus, V. L. (2018). Dynamical origins of heat capacity changes in enzyme-catalysed reactions. *Nature Communications*, 9(1), 1177.
- Karshikoff, A., Nilsson, L., & Ladenstein, R. (2015). Rigidity versus flexibility: the dilemma of understanding protein thermal stability. *The FEBS Journal*, 282(20), 3899-3917
- Kell, D. B. (1982). Enzymes as energy 'funnels'?. *Trends in Biochemical Sciences*, 7(10), 349.
- Kohno, M., Arakawa, T., Ota, H., Mori, T., Nishimoto, T., & Fushinobu, S. (2018). Structural features of a bacterial cyclic α -maltosyl-(1 \rightarrow 6)-maltose (CMM) hydrolase critical for CMM recognition and hydrolysis. *Journal of Biological Chemistry*, 293(43), 16874-16888.
- Kurihara, T., Yamauchi, T., Ichiyama, S., Takahata, H., & Esaki, N. (2003). Purification, characterization, and gene cloning of a novel fluoroacetate dehalogenase from *Burkholderia* sp. FA1. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 23(2-6), 347-355.
- Labar, G., Bauvois, C., Borel, F., Ferrer, J. L., Wouters, J., & Lambert, D. M. (2010). Crystal structure of the human monoacylglycerol lipase, a key actor in endocannabinoid signaling. *Chembiochem*, 11(2), 218-227.
- Ladenstein, R. (2008). Heat capacity, configurational entropy, and the role of ionic interactions in protein thermostability. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 22(1), 612-619.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680.
- Laidler, K. J. (1984). The development of the Arrhenius equation. *Journal of Chemical Education*, 61(6), 494.
- Lebediker, M., & Danieli, T. (2011). Purification of proteins fused to maltose-binding protein. *In Protein Chromatography* (pp. 281-293). Humana Press.
- Levinthal, C. (1968). Are there pathways for protein folding?. *Journal de Chimie Physique*, 65, 44-45.

- MacEachran, D. P., Ye, S., Bomberger, J. M., Hogan, D. A., Swiatecka-Urban, A., Stanton, B. A., & O'Toole, G. A. (2007). The *Pseudomonas aeruginosa* secreted protein PA2934 decreases apical membrane expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Infection and Immunity*, 75(8), 3902-3912.
- Makhatadze, G. I., & Privalov, P. L. (1992). Protein interactions with urea and guanidinium chloride: a calorimetric study. *Journal of Molecular Biology*, 226(2), 491-505.
- Mansoor, S. E., DeWitt, M. A., & Farrens, D. L. (2010). Distance mapping in proteins using fluorescence spectroscopy: the tryptophan-induced quenching (TriQ) method. *Biochemistry*, 49(45), 9722-9731.
- Marianayagam, N. J., Sunde, M., & Matthews, J. M. (2004). The power of two: protein dimerization in biology. *Trends in Biochemical Sciences*, 29(11), 618-625.
- McCarthy, J., Hopwood, F., Oxley, D., Laver, M., Castagna, A., Righetti, P. G., & Herbert, B. (2003). Carbamylation of Proteins in 2-D Electrophoresis Myth or Reality?. *Journal of Proteome Research*, 2(3), 239-242.
- McCulloch, K. M., Mukherjee, T., Begley, T. P., & Ealick, S. E. (2010). Structure determination and characterization of the vitamin B6 degradative enzyme (E)-2-(acetamidomethylene) succinate hydrolase. *Biochemistry*, 49(6), 1226-1235.
- Montecinos-Franjola, F., Ross, J. A., Sánchez, S. A., Brunet, J. E., Lagos, R., Jameson, D. M., & Monasterio, O. (2012). Studies on the dissociation and urea-induced unfolding of FtsZ support the dimer nucleus polymerization mechanism. *Biophysical Journal*, 102(9), 2176-2185.
- Mukai, K., Watanabe, H., Kubota, M., Chaen, H., Fukuda, S., & Kurimoto, M. (2006). Purification, characterization, and gene cloning of a novel maltosyltransferase from an *Arthrobacter globiformis* strain that produces an alternating α -1, 4- and α -1, 6-cyclic tetrasaccharide from starch. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(2), 1065-1071.
- Nagel, Z. D., & Klinman, J. P. (2006). Tunneling and dynamics in enzymatic hydride transfer. *Chemical Reviews*, 106(8), 3095-3118.
- Navia-Paldanius, D., Savinainen, J. R., & Laitinen, J. T. (2012). Biochemical and pharmacological characterization of human α/β -hydrolase domain containing 6 (ABHD6) and 12 (ABHD12). *Journal of Lipid Research*, jlr-M030411.
- New England Biolabs: Making your own electrocompetent cells. (2015) protocols.iodx.doi.org/10.17504/protocols.io.crtv6m
- Nelson, D.L., & Cox, M.M. (2009). Lehninger principles of biochemistry 5th edition. New York: WH Freeman.
- Perez Pons, J. A., Cayetano, A., Rebordosa, X., Lloberas, J., Guasch, A., & Querol, E. (1994). A β -glucosidase gene (bgl3) from *Streptomyces* sp. strain QM-B814: Molecular cloning, nucleotide sequence, purification and characterization of the encoded enzyme, a new member of family 1 glycosyl hydrolases. *European Journal of Biochemistry*, 223(2), 557-565.
- Raran-Kurussi, S., Keefe, K., & Waugh, D. S. (2015). Positional effects of fusion partners on the yield and solubility of MBP fusion proteins. *Protein Expression and Purification*, 110, 159-164.
- Reddy K, R. C., Lilie, H., Rudolph, R., & Lange, C. (2005). L-Arginine increases the solubility of unfolded species of hen egg white lysozyme. *Protein Science*, 14(4), 929-935.

- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual* (No. Ed. 3). Cold spring harbor laboratory press.
- Seelig, J. (2018). Cooperative protein unfolding. A statistical-mechanical model for the action of denaturants. *Biophysical Chemistry*, 233, 19-25.
- Shukla, D., & Trout, B. L. (2010). Interaction of arginine with proteins and the mechanism by which it inhibits aggregation. *The Journal of Physical Chemistry B*, 114(42), 13426-13438.
- Srere, P. A. (1984). Why are enzymes so big? *Trends in Biochemical Sciences*, 9(9), 387-390.
- Truhlar, D. G. (2015). Transition state theory for enzyme kinetics. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 582, 10-17.
- Walters, J., Milam, S. L., & Clark, A. C. (2009). Practical approaches to protein folding and assembly: spectroscopic strategies in thermodynamics and kinetics. *Methods in Enzymology*, 455, 1-39.
- Wedemeyer, W. J., Welker, E., Narayan, M., & Scheraga, H. A. (2000). Disulfide bonds and protein folding. *Biochemistry*, 39(15), 4207-4216.
- Whitford, D. (2013). *Proteins: structure and function*. John Wiley & Sons.
- Yuan, B., Yokochi, N., Yoshikane, Y., Ohnishi, K., Ge, F., & Yagi, T. (2008). Gene identification and characterization of the pyridoxine degradative enzyme α -(N-acetylamino)methylene succinic acid amidohydrolase from *Mesorhizobium loti* MAFF303099. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 54(3), 185-190.
- Zhou, H. X., & Pang, X. (2018). Electrostatic interactions in protein structure, folding, binding, and condensation. *Chemical Reviews*, 118(4), 1691-1741.