



Secretaría de Educación Pública



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO  
Instituto Tecnológico de Veracruz

**Cristalización de la esterasa de  
*Geobacillus thermoleovorans* CCR11  
y determinación de su estructura terciaria.**

Tesis

Que para obtener el grado de:  
Doctora en Ciencias en Alimentos

Presenta:

M. C. Graciela Espinosa Luna

Asesores:

Dra. Rosamaría Oliart Ros

Dra. Beatriz Torrestiana Sánchez

Dr. Enrique Rudiño Piñera - UNAM

H. Veracruz, Ver.

28 de Junio 2018

A Arnulfo, Graciela, Carolina, Aide, Lupita, Juan José, Paulina por  
su amor, apoyo e impulso de siempre.

A Héctor, Santiago, Guillermo, Mauricio, gracias, valió la pena.

A Sergio García Sánchez, gracias Profesor.

## RECONOCIMIENTOS

Agradezco a Biol. Sonia Rojas Trejo, Dra. Guadalupe Zavala Padilla y Dra. Adelaida Díaz Vilchis del Instituto de Biotecnología de la UNAM; Dra. Lorena Lopez Sánchez del Clúster Biomimic del INECOL y Dr. Federico Del Río Portilla del Instituto de Química de la UNAM.

Agradezco a Dr. Enrique Rudiño Piñera del Instituto de Biotecnología de la UNAM, Dr. Miguel José Yacamán de la Universidad de Texas en San Antonio, y a mis asesoras de UNIDA Dra. Rosamaría Oliart Ros y Dra. Beatriz Torrestiana Sánchez.

Agradezco a CONACyT la beca otorgada y el financiamiento para la realización de este proyecto.

## RESUMEN

Espinosa Luna, Graciela. D. en C. Instituto Tecnológico de Veracruz. Junio 2018. Cristalización de la esterasa de *Geobacillus thermoleovorans* CCR11 y determinación de su estructura terciaria. Asesores: Dra. Rosa María Oliart Ros, Dra. Beatriz Torrestiana Sánchez, Dr. Enrique Rudiño Piñera.

*Geobacillus* es un género de bacterias termófilas que está ampliamente distribuido en el planeta, posee lipasas y carboxilesterasas cuya importancia como herramienta biotecnológica radica en su capacidad de reaccionar en forma quimio, regio y estereo selectiva, en presencia de solventes orgánicos. CaesCCR11 es una carboxilesterasa producida por el microorganismo termófilo *Geobacillus thermoleovorans* CCR11, cuya clonación y posterior caracterización indicó que presentó actividad a 50 °C y se incrementó cuando se incubó a pH 9.0 y a 60 °C, por 20 min. Del análisis *in silico* de la estructura primaria se encuentra que tiene 250 residuos y más de la mitad son hidrofóbicos, tiene *pI* de 5.31 y 27.3 kDa, es monomérica y pertenece a la familia XV de carboxilesterasas (Espinosa, 2013). El objetivo general de este trabajo de investigación fue profundizar en el conocimiento bioquímico y estructural de la esterasa (CaesCCR11) producida por *Geobacillus thermoleovorans* CCR11.

Primeramente la enzima se purificó por medio de electroforesis preparativa, se concentró por evaporación centrífuga y después de dializarla se estabilizó con ASB14 y NaCl. La proteína purificada y soluble se colocó en más de 1300 pozos de cristalización con soluciones de kits comerciales. Se encontraron cinco condiciones con cristales de proteína de las que se eligió una, misma que se mejoró y con la que se obtuvieron microcristales y un monocristal. Los microcristales fueron observados en un microscopio electrónico de transmisión JEM 2010F. No fue posible determinar la estructura de la proteína, por lo que es imprescindible mejorar el traslado, la colocación de los cristales en la rejilla y la crioinmersión. Por otro lado, el monocristal fue llevado a difractar por rayos X, el resultado obtenido fue que no hubo patrón

de difracción debido a un desorden presente en el cristal. El análisis de la proteína en solución por RMN, confirmó el desorden presente también en la proteína soluble.

De manera alternativa fue posible predecir la estructura terciaria de CaesCCR11 utilizando el programa Raptor-X. El resultado fue que CaesCCR11 posee seis hélices- $\alpha$  y siete hojas- $\beta$  del plegamiento canónico  $\alpha/\beta$  hidrolasa, un dominio de tapa de 44 residuos, un agujero oxianión (Phe 29 y Met 98), la triada catalítica (Ser97, Asp196 e His226) y ocho puentes de sal. Además, en la caracterización molecular se encontró que el gen que codifica para CaesCCR11 (*caesccr11*) forma parte de un operón junto con una proteína de membrana no identificada (*duf*). Presumiblemente la expresión del operón se induce en condiciones de estrés para la célula, lo que pudiera sugerir una nueva función de las esterasas intracelulares.

## ABSTRACT

Espinosa Luna, Graciela. Ph D. Instituto Tecnológico de Veracruz. June 2018. Crystallization of *Geobacillus thermoleovorans* CCR11 esterase and determination of its tertiary structure. Advisors: Dra. Rosa María Oliart Ros, Dra. Beatriz Torrestiana Sánchez, Dr. Enrique Rudiño Piñera.

*Geobacillus* is a genus of thermophilic bacteria that is widely distributed on the planet, it produces lipases and carboxyl esterases whose importance as a biotechnological tool relies in its chemo, regio and stereo selectivity, in the presence of organic solvents.

CaesCCR11 is a carboxyl esterase produced by the thermophilic bacteria *Geobacillus thermoleovorans* CCR11, whose cloning and subsequent characterization indicate that it has activity at 50°C and increases when incubated at pH 9.0 and 60°C, for 20 min. From the *in silico* analysis of the primary structure it is found that it has 250 residues and more than half of them are hydrophobic, has pI of 5.31 and 27.3 kDa, is monomeric and belongs to the XV family of carboxyl esterases.

The purpose of this work was to deepen in the biochemical and structural characteristics of the esterase (CaesCCR11) produced by *Geobacillus thermoleovorans* CCR11.

First, the enzyme was purified by preparative electrophoresis, concentrated by centrifugal evaporation, dialyzed and stabilized with ASB14 and NaCl; with the purified and soluble protein, more than 1300 crystallization wells were placed in commercial kits, five successful conditions were found, one was chosen for improvement and with which microcrystals and a monocrystal were obtained. The microcrystals were observed in the JEM 2010F transmission electron microscope. It was not possible to determine the structure of the protein, so it is essential to improve the transfer, the placement of the crystals in the grid and the cryoimmersion. On the other hand, the monocrystal was taken for X-ray diffraction and the result was that there was no diffraction pattern due to a disorder present in the crystal. Analysis of the protein in solution by NMR confirmed the disorder present in the soluble protein.

Alternatively, it was possible to predict the tertiary structure of CaesCCR11 using the Raptor-X program. The result was that CaesCCR11 has six  $\alpha$ -helix and seven  $\beta$ -sheet of the canonical folding  $\alpha/\beta$  hydrolase, a lid domain of 44 residues, an oxyanion hole (Phe 29 and Met 98), the catalytic triad (Ser97, Asp196 and His226) and eight salt bridges. In addition, the molecular characterization showed that the gene that encodes for CaesCCR11 (*caesccr11*) is part of an operon along with an unidentified membrane protein (*duf*). Presumably operon expression is induced under conditions of stress to the cell, which may suggest a new function of intracellular esterases.

## CONTENIDO

1. Introducción.....	1
2. Antecedentes.....	3
2.1 Determinación de la estructura terciaria de proteínas.....	3
2.1.1 Resonancia magnética nuclear.....	3
2.1.2 Difracción de neutrones.....	7
2.1.3 Difracción de Rayos X.....	8
2.1.4 Difracción de electrones.....	9
2.2 Cristalización de proteínas.....	12
2.2.1 Métodos de cristalización de proteínas.....	14
2.3 Purificación de proteínas.....	15
2.3.1 Métodos cromatográficos en la purificación de proteínas lipolíticas.....	15
2.3.2 Uso de membranas en la purificación de proteínas no lipolíticas.....	19
2.4 Estructura terciaria de carboxilesterasas de microorganismos termófilos: estado del arte.....	22
2.5 Antecedentes directos de este trabajo.....	26
3. Justificación e hipótesis.....	30
3.1 Justificación .....	30
3.2 Hipótesis .....	30
4. Objetivos.....	31
4.1 Objetivo general .....	31
4.1.1 Objetivos específicos.....	31
5. Materiales y Métodos.....	32
5.1 Microorganismos y reactivos.....	32
5.2 Técnicas analíticas.....	33

5.2.1	Determinación cuantitativa de la actividad enzimática.....	33
5.2.2	Cuantificación de proteína.....	33
5.2.2.1	Método de Bradford.....	33
5.2.2.2	Determinación espectrofotométrica absorbancia UV.....	34
5.2.3	Electroforesis en mini gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	34
5.2.3.1	Actividad lipolítica <i>in situ</i> (zimograma).....	35
5.2.4	Determinación del punto isoeléctrico de proteínas en el extracto crudo mediante Rotofor.....	35
5.2.5	Determinación de tamaño de partícula.....	35
5.2.6	Micrografías de microscopía electrónica de transmisión.....	36
5.3	Producción de CaesCCR11 recombinante.....	36
5.3.1	Preparación del inóculo.....	37
5.3.2	Preparación del cultivo e inducción de la expresión de CaesCCR11.....	38
5.3.3	Obtención del extracto crudo.....	38
5.3.4	Obtención del extracto térmico.....	38
5.3.5	Purificación de CaesCCR11 por ultrafiltración.....	39
5.3.5.1	Modificaciones químicas a la membrana de ultrafiltración.....	39
5.3.5.2	Proceso de ultrafiltración.....	40
5.3.6	Purificación de CaesCCR11 por electroforesis preparativa.....	41
5.4	Desagregación de CaesCCR11.....	42
5.4.1	Evaluación de la desagregación en extracto crudo.....	43
5.4.2	Evaluación de la desagregación en CaesCCR11 purificada.....	43
5.5	Cristalización de CaesCCR11.....	43
5.5.1	Primera fase: exploración de condiciones de cristalización.....	44
5.5.2	Segunda fase: optimización de la condición de cristalización.....	44
5.5.3	Análisis de condiciones de cristalización de CaesCCR11.....	46
5.5.3.1	Cristal unitario.....	47
5.5.3.2	Micro cristales.....	47

5.6	Análisis molecular del operón <i>duf-caes</i> en el genoma de <i>Geobacillus thermoleovorans</i> CCR11.....	47
5.6.1	Producción de CaesCCR11 desde la cepa nativa <i>G. thermoleovorans</i> CCR11	49
5.6.2	Extracción de ADN cromosómico.....	50
5.6.2.1	Amplificación de los genes <i>duf</i> y <i>caes</i> por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	50
5.6.3	Extracción de ARN mensajero, conversión a ADN complementario y amplificación por PCR.....	52
5.6.4	Análisis bioinformático de las secuencias.....	52
6.	Resultados y Discusión.....	54
6.1	Determinación del punto isoeléctrico de proteínas en el extracto crudo.....	54
6.2	Obtención del extracto térmico de CaesCCR11.....	55
6.3	Purificación de CaesCCR11 por ultrafiltración.....	61
6.4	Purificación de CaesCCR11 por electroforesis preparativa.....	67
6.5	Desagregación de CaesCCR11.....	72
6.5.1	Evaluación de agentes desagregantes en extracto crudo.....	73
6.5.2	Evaluación de agentes desagregantes en CaesCCR11 purificada.....	76
6.6	Cristalización de CaesCCR11.....	81
6.6.1	Exploración de condiciones de cristalización para CaesCCR11.....	81
6.6.2	Microcristales de CaesCCR11.....	83
6.6.3	Cristal unitario de CaesCCR11.....	90
6.7	Desorden de CaesCCR11.....	91
6.8	Predicción de la estructura terciaria de CaesCCR11.....	94
6.9	Caracterización molecular de CaesCCR11.....	96
7.	Conclusiones.....	108
8.	Recomendaciones.....	109
9.	Referencias.....	110
	Apéndices.....	118

## LISTA DE TABLAS

2.1 Algunos componentes de la solución precipitante.....	13
5.1 Ensayos preliminares y condición final de la precipitación térmica.....	39
5.2 Diseño de experimentos para ultrafiltración con membrana de 100 kDa de celulosa regenerada.....	41
5.3 Kits de cristalización comerciales utilizados en la primera fase de cristalización de CaesCCR11.....	45
5.4 Programa para amplificación de los genes caes y duf por PCR.....	51
6.1 Datos de purificación y recuperación de CaesCCR11 después de la precipitación térmica a 60°C por 30 min correspondiente a la Figura 6.2.....	56
6.2 Datos de purificación y recuperación de CaesCCR11 después de la precipitación térmica a 60°C por 10 y 20 min. correspondiente a la Figura 6.3.....	58
6.3 Datos de purificación y recuperación de CaesCCR11 después de la precipitación térmica a 60°C por 10 min a pH 5.6 y por 3 min a pH 7.5. correspondiente a la Figura 6.4.....	61
6.4 Datos de purificación de los distintos tratamientos propuestos para la purificación por ultrafiltración.....	63
6.5 Cuantificación relativa de las bandas de proteínas de los distintos tratamientos propuestos según la Figura 6.5.....	66
6.6 Datos de purificación y recuperación global de CaesCCR11 después del proceso de purificación desarrollado.....	70
6.7 Efecto de los detergentes probados para la desagregación en la actividad enzimática de CaesCCR11.....	77
6.8 Efecto de los detergentes probados para la desagregación en el tamaño de partícula de CaesCCR11.....	78

6.9 Efecto de la concentración del ASB14 en el tamaño de partícula de CaesCCR11 purificada.....	80
6.10 Condiciones de cristalización para CaesCCR11 del kit JB Screen Membrane 3 (CS-303L).....	82
6.11 Puntuaciones de calidad del modelo obtenido para CaesCCR11.....	96
6.12 Puntuaciones de calidad de los modelos obtenidos para Duf.....	103

## LISTA DE FIGURAS

2.1 Espectro de correlación cuántica simple heteronuclear $^{15}\text{N}$ -HSQC de FHA-1 (azul), FHA-2 (rojo) y módulo regulador completo (negro).....	5
2.2 Estructura secundaria de FHA-1 (azul) y FHA-2 (rojo) mediante RMN.....	6
2.3 Mapas de densidad nuclear (A) a una resolución de 2.0 Å y de densidad electrónica (B) a una resolución de 0.85 Å del sitio activo de DHFR en complejo con folato y NADP+.....	7
2.4 Diagrama esquemático de fases de una mezcla de proteína y solución precipitante...	12
2.5 Técnicas para cristalización de proteínas.....	14
5.1 Diagrama de flujo de las operaciones llevadas a cabo en la purificación de CaesCCR11 recombinante.....	37
5.2 Diagrama de flujo para la expresión de CaesCCR11 desde la cepa nativa y su expresión desde el ARN en operón con <i>duf</i> .....	48
6.1 Electroforesis de gel de poliacrilamida al 12% en condiciones disociantes de las fracciones colectadas del Rotofor.....	54
6.2 Electroforesis de gel de poliacrilamida al 12% en condiciones disociantes de las muestras obtenidas de la precipitación térmica con y sin Tritón X-100.....	56
6.3 Electroforesis de gel de poliacrilamida al 12% en condiciones disociantes de las muestras obtenidas de la precipitación térmica con Tritón X-100 al 2% (v/v).....	57
6.4 Electroforesis de gel de poliacrilamida al 12% en condiciones disociantes de las muestras obtenidas de la precipitación térmica a pH 5.6 y pH 7.5.....	60
6.5 Electroforesis de gel de poliacrilamida al 12% en condiciones disociantes de los distintos procesos de ultrafiltración.....	62
6.6 Electroforesis de gel de poliacrilamida al 12% en condiciones disociantes del agua de enjuague de la membrana de celulosa regenerada utilizada en ultrafiltración.....	65

6.7 Análisis de fracciones colectadas de la electroforesis preprativa. (A) Determinación de actividad lipolítica, (B) Determinación de proteína y (C) Actividad específica de cada fracción.....	69
6.8 Electroforesis de geles de poliacrilamida al 14.5 % en condiciones disociantes de algunas fracciones seleccionadas en la colecta a la salida de la electroforesis preparativa.....	70
6.9 Electroforesis de gel de poliacrilamida al 14.5 % en condiciones disociantes del proceso global de purificación por electroforesis preparativa.....	71
6.10 Estudios de desagregación de CaesCCR11 con isopropanol, SDS y Tritón X-100...	74
6.11 Micrografías de microscopía electrónica de transmisión de agregados de proteínas con detergentes.....	79
6.12 Electroforesis de gel de poliacrilamida al 14.5 % en condiciones disociantes de la proteína purificada lista para poner condiciones de cristalización.....	81
6.13 Cristales de CaesCCR11 obtenidos a 18 °C después de cinco semanas, con las soluciones del kit JB Screen Membrane 3 (CS-303L).....	82
6.14 Microcristales de CaesCCR11 obtenidos a 18 °C después de dos semanas, con diversas optimizaciones de las soluciones del kit JB Screen Membrane 3 (CS-303L).....	84
6.15 Microcristales de CaesCCR11 obtenidos a los cuatro días de incubación. (A) fotografía de microscopio estereoscópico y (B) micrografía de microscopio electrónico de transmisión.....	85
6.16 Fotografías de microscopio óptico digital Olympus DSX500 de los pozos de la caja de cristalización de CaesCCR11 por gota colgante, llevados a la Universidad de Texas.....	86
6.17 Micrografías de microscopía electrónica de barrido (ZEISS GeminiSEM) de las gotas de cristalización .....	87
6.18 Micrografías de microscopía electrónica de barrido (ZEISS GeminiSEM) de las gotas de cristalización con diferentes crioprotectores al 30 %.....	88

6.19 Micrografías de microscopía electrónica de transmisión (JEOL JEM 2010F) de las gotas de cristalización donde se aprecia la presencia de cristales de proteína.....	89
6.20 Espectros 1D, 500 MHz, 25 °C, secuencia de pulsos de supresión de agua DPGSE y 256 transientes de la proteína en solución CaesCCR11 en amortiguador Tris HCl 0.02 M pH 7.5.....	92
6.21 Predicción del desorden en la proteína a partir de la secuencia de aminoácidos. (A) CaesCCR11 y (B) Fosfoproteína soluble tilacoidal.....	93
6.22 Predicción de la estructura terciaria de CaesCCR11 con el servidor RaptorX .....	95
6.23 Electroforesis horizontal de gel de agarosa al 1 % de los productos amplificados por PCR usando el ADN de <i>G. thermoleovorans</i> CCR11 como templado y los oligonucleótidos iniciadores directo y reverso para los genes de <i>caesccr11</i> y <i>duf</i> ...	97
6.24 Secuencia del operón <i>duf-caesccr11</i> .....	98
6.25 Ubicación del operón <i>duf-caesccr11</i> . (A) En el genoma completo de <i>G. thermoleovorans</i> KCTC hallado en la base de datos de NCBI y (B) en la base de datos de STRING.....	99
6.26 Predicción de la estructura secundaria de Duf a partir de la secuencia de aminoácidos. (A) Con el servidor Phyre2 y (B) Con el servidor DAS TM.....	100
6.27 Comparación de la hidrofobicidad de Duf y CaesCCR11 basada en la escala de Kyte y Doolittle.....	102
6.28 Predicción de la estructura terciaria para Duf por medio del servidor RaptorX.....	103
6.29 Electroforesis de gel de poliacrilamida al 12 % en condiciones disociantes de la expresión de CaesCCR11 en forma nativa, a 55 °C en medio de cultivo Schmidt-Dannert.....	105
6.30 Electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1 % de los productos amplificados por PCR, a partir del ADN complementario de la expresión nativa de CaesCCR11.	106

## LISTA DE ABREVIATURAS

ABPS	Ácido bromo propano sulfónico
ASB14	Amido sulfo betaína 14
CHAPS	3-(3-colamidopropil) dimetil amonio propano sulfonato
DO	Densidad óptica
EDTA	Ácido etilén diamino tetraacético
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazin etano sulfónico
IBT	Instituto de Biotecnología
ICNAM	Centro Internacional para la Nanotecnología y Materiales Avanzados
IPTG	Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido
IQ	Instituto de Química
LB	Medio de cultivo Luria Bertani
MES	Ácido 2-morfolino etano sulfónico
MOPS	Ácido 3-(N-morfolino) propano sulfónico
MPD	2-methyl-2,4-pentenediol
MUF-	Metilumberliferil
MWCO	Peso molecular de corte nominal
<i>p</i> -NP	<i>para</i> -nitrofenil
pb	Pares de bases
PEG	Polietilén glicol
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PMSF	Fluoruro de fenil metil sulfonilo
RMN	Resonancia magnética nuclear
SD	Medio de cultivo Schmidt-Dannert
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SSRL	Fuente de luz de radiación de sincrotrón de Stanford

## INTRODUCCIÓN

Las lipasas son enzimas ubicuas, producidas en los tres dominios de la vida. Las primeras lipasas que se estudiaron fueron de origen animal, se obtuvieron a partir del páncreas porcino y se usaron como auxiliar en la digestión, ya sea en forma mixta con otras enzimas pancreáticas o en forma purificada. Debido a las dificultades de abasto de páncreas de origen animal, surgió el interés en las lipasas de origen microbiano, la principal ventaja es que su abasto es regulable debido a su cultivo en fermentadores y a su rápido crecimiento, y a diferencia de las plantas, su producción no requiere de grandes extensiones ni está sujeta a ciclos estacionales (Hasan *et al.*, 2006).

Posteriormente con el surgimiento de las técnicas de biología molecular y más recientemente con el estudio de los microorganismos extremófilos, ha surgido el interés por aquellas lipasas producidas por microorganismos termófilos e hipertermófilos, cuya temperatura óptima de crecimiento se encuentra por arriba de 50 °C y 80 °C, respectivamente. Los microorganismos termófilos se encuentran más ampliamente distribuidos en la naturaleza que los hipertermófilos, y están representados por varias especies de bacterias y arqueas (Morozkina *et al.*, 2010). El caso de los termófilos del género *Geobacillus* ha sido motivo de estudio debido a su amplia distribución en el planeta, no sólo en la cantidad y diversidad de nichos del que ha sido aislado sino por el número en el que se la ha hallado; su resistencia y prevalencia se debe a que tiene una vida latente en forma de esporas que resisten la radiación UV en forma comparable con *Deinococcus radiodurans* (Zeigler, 2014; Studholme, 2014).

Las enzimas de microorganismos termófilos son de interés biotecnológico por poseer características de resistencia a la desnaturalización en alta temperatura; se han identificado amilasas y glucosidasas utilizadas en panificación, lipasas que se usan en el tratamiento de

aguas residuales y en detergentes, xilanasas en la industria del papel, proteasas en la producción de alimentos y en la formulación de detergentes, así como ADN polimerasas para la amplificación de fragmentos en ingeniería genética (Schiraldi y De Rosa, 2002).

Las causas por las que las enzimas de microorganismos termófilos son resistentes a altas temperaturas, así como la forma en que reaccionan con el sustrato se han determinado con la creciente elucidación de sus estructuras tridimensionales. En este proyecto de investigación se utilizó la enzima lipolítica CaesCCR11, producida en forma nativa por el termófilo *Geobacillus thermoleovorans* CCR11 y clonada en *Escherichia coli* con el vector de expresión pET-3b.

El objetivo general de este trabajo fue: Profundizar en el conocimiento bioquímico y estructural de la esterasa (CaesCCR11) producida por *Geobacillus thermoleovorans* CCR11. Los objetivos específicos fueron: (i) Obtener la enzima CaesCCR11 con la pureza y la cantidad necesaria para realizar la cristalización, (ii) Obtener un cristal del tamaño apropiado para determinar la estructura terciaria y (iii) Elucidar la estructura terciaria de CaesCCR11.

## ANTECEDENTES

### 2.1 Determinación de la estructura terciaria de proteínas

La estructura terciaria de las proteínas es la forma en que se acomodan los plegamientos de hélice- $\alpha$  y hoja- $\beta$  en el espacio. Es posible conocerla a partir del patrón de difracción obtenido al incidir un haz de electrones, neutrones o de rayos X en el cristal de la proteína de estudio. Si no se tiene la proteína cristalizada pero se encuentra pura en solución, puede encontrarse su estructura terciaria por medio de la resonancia magnética nuclear.

#### 2.1.1 Resonancia Magnética Nuclear

Para la determinación de la estructura terciaria de las proteínas en solución, se utiliza el análisis de resonancia magnética nuclear (RMN), que se basa en el espín de las partículas subatómicas. El espín es resultado del momento angular producido por un campo magnético a las partículas. Cuando se introduce un campo magnético externo, el núcleo se comporta como un pequeño imán y tiende a orientarse, preferentemente, a favor del campo magnético. Si se aplica energía que obligue a los núcleos a invertir el sentido de su orientación con respecto al campo magnético, se dice que el sistema está en resonancia. A este fenómeno de excitación de los espines nucleares se le conoce como resonancia magnética nuclear (del Río, 2003).

Para realizar el análisis de estructura terciaria de proteínas mediante RMN es necesario tener la proteína pura en solución y que sea estable por un periodo largo, además que no debe estar en un amortiguador de alta fuerza iónica porque éste crearía señales interferentes en el espectro de RMN. También es imprescindible conocer la estructura primaria de la proteína para facilitar el análisis de los espectros (Amero, 2011).

En relación a los espectros de RMN, éstos deben ser en dos dimensiones para poder interpretar todas las señales (en una sola dimensión las señales se superponen cuando se trata de proteínas) y asignarlas a un aminoácido en particular. Esto se realiza con los espectros COSY (Correlation Spectroscopy) cuando el traslape es pequeño, TOCSY (Total Correlation Spectroscopy) si el traslape es grande, y NOESY (Two dimensional Nuclear Overhauser Spectroscopy) para asignar el conjunto de señales al aminoácido correspondiente (Amero, 2011).

Wishart *et al.* (1992) propusieron un procedimiento para identificar las hojas- $\beta$ , las hélices- $\alpha$  y los giros en las proteínas. Establecieron un rango del desplazamiento químico del protón- $\alpha$  ( $\alpha$ -CH  $^1\text{H}$  NMR) de cada aminoácido. Conociendo la secuencia de la proteína y el desplazamiento químico atribuido al protón- $\alpha$  de cada aminoácido en un espectro de dos dimensiones, fue posible comparar el valor obtenido con el rango para el aminoácido correspondiente. De la comparación se asigna +1 si el valor obtenido es mayor que el rango, 0 si cae dentro del rango y -1 si es menor que el rango. Una ventana de cuatro o más asignaciones -1 es una hélice- $\alpha$ ; una ventana de tres o más asignaciones +1 es una hoja- $\beta$ , todo lo demás son giros.

Una ventaja de la RMN en el estudio de proteínas es que permite ver las interacciones entre biomoléculas, en solución. La desventaja es que su estudio está limitado a proteínas pequeñas (del Río, 2003).

El transportador ABC-Rv1747 (ATP-bounded cassette) está formado por 865 aminoácidos divididos en: una región transmembrana, una región de unión a nucleótidos y un módulo de regulación de 310 aminoácidos en el citoplasma. Heinkel *et al.* (2018) expresaron y purificaron en forma recombinante el módulo de regulación y elucidaron su estructura terciaria por medio de RMN. Éste consta de dos dominios independientes FHA 1 y 2 unidos por una región intrínsecamente desordenada que tiene dos treoninas fosforiladas T152 y T210.

Los espectros de correlación cuántica única heteronuclear (HSQC) de  $^{15}\text{N}$  de los dominios FHA-1 y FHA-2 mostraron picos cruzados dispersos atribuidos a las regiones bien ordenadas de los dominios de FHA y picos más intensos y agudos con desplazamientos químicos de enrollamientos al azar  $^1\text{H}^{\text{N}}$  de 8-8,5 ppm que se originaron a partir de los aminoácidos de la región intrínsecamente desordenada que sirve de unión entre los dominios FHA-1 y FHA-2 (Figura 2.1). Consistente con esta interpretación, un análisis de los desplazamientos químicos de la cadena principal  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  y  $^{15}\text{N}$  indicó la presencia de dominios de hojas- $\beta$  (Figura 2.2). Por su parte, los residuos de la región intrínsecamente desordenada exhibieron parámetros indicativos de trastorno conformacional. (Heinkel *et al.*, 2018)

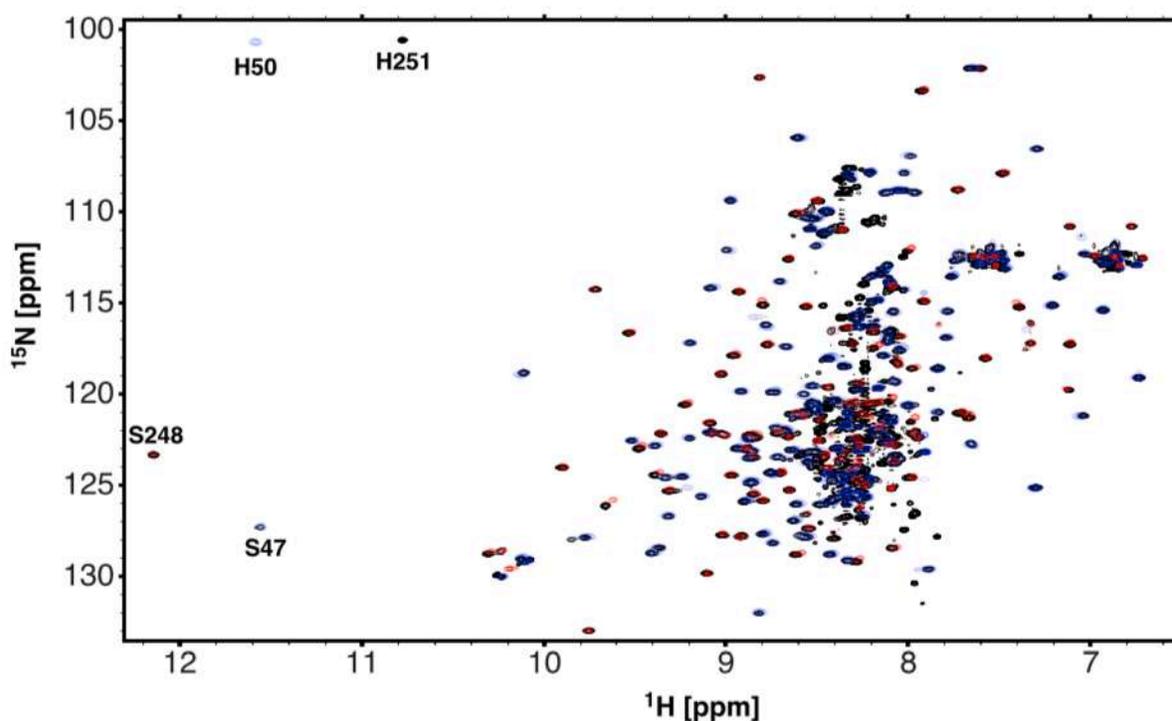


FIGURA 2.1 Espectro de correlación cuántica simple heteronuclear  $^{15}\text{N}$ -HSQC de FHA-1 (azul), FHA-2 (rojo) y módulo regulador completo (negro). S47 y S248 es el desplazamiento químico atribuido a las amidas de las serinas, así como H50 y H251 son señales debidas al imidazol de las histidinas. (Heinkel *et al.*, 2018)

Basado en la falta de perturbaciones debidas al desplazamiento químico de la amida, se puede inferir que los dos dominios con plegamiento ordenado FHA 1 y 2 no interactúan entre ellos cuando están unidos como un polipéptido continuo no fosforilado. Estos datos demuestran que el módulo regulador tiene una organización concatenada con dos dominios FHA estructuralmente independientes unidos por una región intrínsecamente desordenada. (Heinkel *et al.*, 2018)

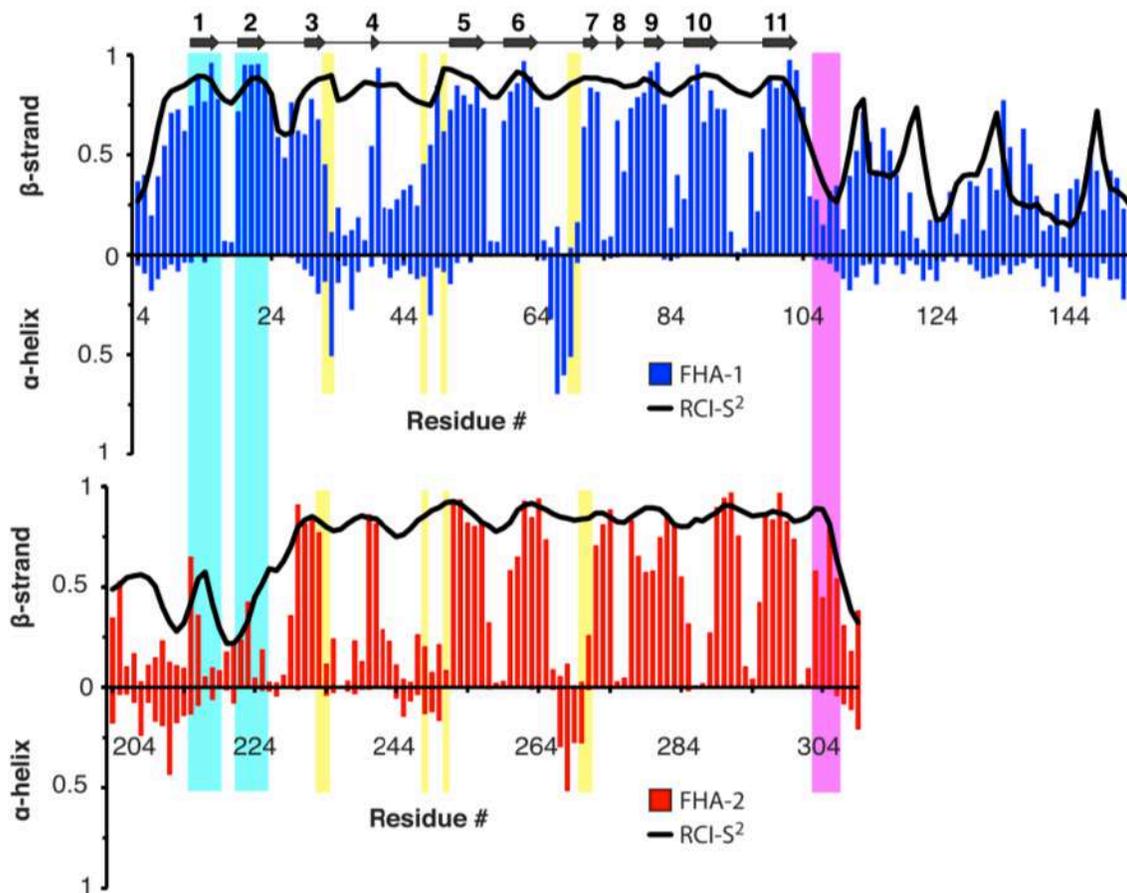


FIGURA 2.2 Estructura secundaria de FHA-1 (azul) y FHA-2 (rojo) mediante RMN. Estandarización normalizada de las hojas- $\beta$  y de las hélices- $\alpha$  (histogramas) y los valores de RCI-S<sup>2</sup> (líneas negras; los valores decrecientes de 1 a 0 indican una mayor flexibilidad) determinados a partir de los desplazamientos químicos de la cadena principal. Los residuos conservados que son importantes para la unión regulatoria se identifican en amarillo; las hojas  $\beta$ 1 y  $\beta$ 2 del pliegue canónico de la FHA que están presentes en la FHA-1 pero ausentes en la FHA-2 están en turquesa y la hoja- $\beta$  adicional cercana al C-terminal de la FHA-2 está en magenta. También se indican las hojas- $\beta$  (flechas) elucidadas por difracción de rayos X a partir de la estructura cristalina de FHA-1. (Heinkel *et al.*, 2018)

### 2.1.2 Difracción de neutrones

Los neutrones pueden usarse para obtener la estructura terciaria de las proteínas mediante los patrones de difracción producidos por redes cristalinas de proteínas; los neutrones al no poseer carga, pasan de largo por los electrones e inciden directamente en los núcleos atómicos produciendo una dispersión elástica, sin producir un cambio en la intensidad o velocidad con respecto al ángulo de desviación.

Para obtener el patrón de difracción de neutrones se requiere que la proteína esté cristalizada, ya sea como un monocristal relativamente grande, del orden de  $1 \text{ mm}^3$ , o como millones de microcristales en polvo. Utilizando este procedimiento, Wan *et al.* (2014) publicaron el mapa del sitio activo de la dihidrofolato reductasa (DHFR); fue posible detectar estados de protonación en sitios específicos de la enzima para resolver mecanismos relativos a la catálisis ácido-base. Con la difracción de rayos X, la orientación de las moléculas de agua sólo se infiere (el hidrógeno sólo tiene un electrón, que pasa desapercibido), con la difracción de neutrones los átomos de hidrógeno son detectados por su núcleo.

Wan *et al.* (2014) propusieron que el sustrato en el complejo DHFR-folato-NADP<sup>+</sup>, existe un ensamble de estado pseudo-transitivo en forma ceto (Figura 2.3). El aspartato conservado está cargado negativamente y, junto con el ambiente dieléctrico bajo del sitio activo, contribuye a la elevación de  $pK_a$  de N5 de 2.4 a 6.5 en el complejo.

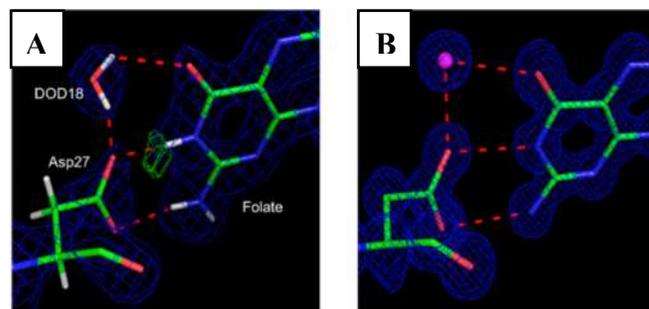


FIGURA 2.3 Mapas de densidad nuclear (A) a una resolución de  $2.0 \text{ \AA}$  y de densidad electrónica (B) a una resolución de  $0.85 \text{ \AA}$  del sitio activo de DHFR en complejo con folato y NADP<sup>+</sup>. DOD18 es la molécula deuterada de agua. (Wan *et al.*, 2014)

### 2.1.3 Difracción de rayos X

Los rayos X se difractan al incidir sobre una muestra cristalina e interactúan con los electrones, generando un patrón de difracción. La longitud de onda de los rayos X es del orden de la longitud de los enlaces en una molécula, por lo que resultan apropiados en la elucidación de la estructura terciaria de las proteínas.

Los rayos X son generados en una estación de sincrotrón o en un equipo de laboratorio de tubo o ánodo rotatorio. Un sincrotrón es una máquina anular de varios cientos de metros de diámetro, que produce haces de rayos X de alta intensidad. Cada haz es guiado a través de una serie de lentes e instrumentos especializados para estudiar el tipo de muestra específico en una estación experimental. Esta estación puede ser controlada de forma remota una vez que ha sido colocada la muestra en la estación. La muestra puede ser un monocristal o en forma de polvo cristalino y el haz puede ser continuo o en forma de pulsos del orden de los femtosegundos.

La estación experimental es un espacio físico donde hay una serie de equipos que llevan el haz de rayos X al material de estudio y donde se registran los datos experimentales. Consta de tres cabinas: la óptica, la experimental y la de control.

La cabina óptica es donde se modifican los rayos X crudos proveídos por el acelerador mediante espejos y cristales para dar la longitud de onda deseada, en este espacio se libera una gran cantidad de calor; la cabina experimental es donde la muestra es acondicionada, a temperatura ambiente, o enfriada con nitrógeno líquido o helio, o confinada en una cámara que controla su atmósfera, reactantes o presión, y donde se encuentran los detectores que capturan y graban los rayos X que pasaron o reflejaron en la muestra. El detector más simple es una placa fotográfica, los detectores del sincrotrón son de un material que cambia el fotón de los rayos X en un fotón de luz visible (detectores de centelleo) o en una señal eléctrica (de carga

acoplada CCD). La cabina de control es donde, por medio de software, se controla el equipo que coloca la muestra, se ajusta el haz de rayos X y se capturan datos de difracción.

Una vez obtenidos los datos de difracción, inicia el refinamiento de la estructura; deben definirse las dimensiones de la celda unitaria, el grupo espacial y aplicarse un método de refinamiento, que puede ser el reemplazo molecular si es que se tiene un modelo de la molécula de la proteína basado en otra estructura de proteínas que tengan una secuencia de aminoácidos similar. Enseguida y basándose en la estructura primaria, se realiza una reconstrucción del modelo, se aplica el refinamiento por el método de Rietveld y se establece la densidad electrónica para dar con el modelo final (Margiolaki y Wright, 2007).

Si no se cuenta con una estructura conocida, similar, para hacer el reemplazo molecular, se puede aplicar el método del reemplazo isomorfo o el de la dispersión anómala simple o múltiple, mediante la medición de las diferencias en la intensidad de la difracción causada por la introducción de átomos pesados, cambiando por ejemplo el azufre de la metionina por selenio.

#### **2.1.4 Difracción de electrones**

La determinación de estructuras cristalinas por medio de la difracción de electrones requiere de un microscopio electrónico de transmisión; se considera a los electrones poseedores de la dualidad onda-partícula, de manera que pueden ser acelerados mediante electrostática potencial hasta un 70% de la velocidad de la luz, cuando el microscopio opera a 200 kV, entregando el haz de electrones a una muy pequeña longitud de onda; existen microscopios de 300 kV capaces de una resolución de 1.65 Å (y por debajo de 1 Å para microscopios de 1000 kV) por lo que el radio ( $1/\lambda$ ) de la esfera de Ewald es mayor en la difracción de electrones que en la difracción por rayos X, dando más información de la distribución bidimensional de los puntos en el patrón (Bendersky y Gayle, 2001).

El cristal que recibe los electrones para ser difractados es un microcristal, de un máximo de 100 nm de espesor (Shi *et al.*, 2013), el haz de electrones puede estar constituido por ondas que viajan en direcciones paralelas (difracción electrónica de área selecta) o en dirección cónica (difracción electrónica de haz convergente). Estos modos de operación son obtenidos por la acción de campos magnéticos y además son complementarios: mediante el área selecta se revela la simetría bidimensional de la red recíproca y con esta información se procede a operar en modo convergente para revelar la geometría tridimensional, pudiendo determinarse las clases cristalinas y la mayoría de los grupos espaciales (Bendersky y Gayle, 2001).

El camino que recorren los electrones es el siguiente: después de incidir sobre la muestra, pasan a través de ella dispersados por la interacción tanto con el núcleo como con los electrones, después pasan a través de un lente que colecta los electrones dispersados en una misma dirección y los enfoca en un solo punto, este es el plano focal del microscopio y es aquí donde se forma la imagen. La manipulación del lente es lo que permite observar el patrón de difracción (espacio recíproco) o la imagen (espacio real).

Para observar la imagen existen dos variantes que dependen del tipo de haz que pasa por el objetivo que está colocado en el plano focal. Cuando sólo se usa el haz transmitido, el modo de observación se conoce como método del campo brillante, y cuando se usa uno de los haces difractados se conoce como método del campo oscuro. El contraste entre estas imágenes se atribuye al cambio en la amplitud de cualquiera de los haces (transmitido o difractado) cuando interaccionó con la muestra mediante la absorción o dispersión dinámica, por ello el contraste de la imagen es conocido como contraste absorción-difracción o contraste por amplitud (Bendersky y Gayle, 2001).

Cuando el haz incidente interactúa con la muestra ocurre un efecto en particular denominado líneas de Kikuchi, estas líneas surgen por las colisiones inelásticas según la Ley

de Bragg pero con un ángulo diferente al de los planos reticulares y aparecen como líneas de intensidad mayor o menor que el fondo del patrón de difracción. Cuando el cristal es rotado o movido de su posición anterior, la intensidad de los puntos del patrón de difracción puede desvanecerse o hacerse más brillante, pero se quedan en el mismo sitio, en cambio las líneas de Kikuchi se mueven a lo largo de la pantalla. Esto ocurre por el origen de los electrones que producen los dos fenómenos: los puntos del patrón de difracción son producidos directamente del haz de electrones que cae o no en el ángulo de Bragg para cada plano. En cambio, los electrones que forman las líneas de Kikuchi se originan por el conjunto de sitios dentro del cristal que producen dispersión inelástica, cuando el cristal se mueve, los sitios también se mueven.

La instrumentación requerida para grabar los patrones de difracción electrónica consiste de una cámara con un sensor que detecte la intensidad luminosa, la convierta en señal eléctrica y la amplifique para que pueda ser utilizada en forma digital. También hay diferencias en los megapíxeles y en el área de la imagen que cubre (Shi *et al.*, 2013).

Los métodos utilizados en la determinación de la estructura terciaria de las proteínas, más que ser excluyentes son complementarios. Dependiendo del tipo de muestra puede requerirse utilizar un tipo de difracción en específico para detectar los núcleos o los electrones. Por otro lado, el tamaño y cantidad de los cristales de proteína obtenidos también es fundamental para el tipo de difracción que pueda realizarse; incluso si la proteína no logra cristalizarse, el recurso más apropiado es la RMN.

Si se obtienen cristales grandes del orden de milímetros, puede aplicarse la difracción de neutrones o de rayos X, en cambio para cristales más pequeños de orden de nanómetros conviene utilizar la difracción de electrones. Si puede producirse una gran cantidad de microcristales, puede utilizarse el recurso de la difracción por pulsos, ya sea por rayos X o

neutrones. En todos los casos el punto de partida es tener la proteína pura, y en específico para la difracción, es indispensable lograr el cristal.

## 2.2 Cristalización de proteínas

Para cristalizar una proteína se requiere de una solución precipitante compuesta de un amortiguador, solventes y polímeros orgánicos, sales y aditivos. La solución precipitante y la solución proteica participan en un intercambio de masa, cambian su concentración en función de la temperatura y a través del tiempo. Cuando el equilibrio se alcanza, la proteína puede quedarse solubilizada, puede precipitar en agregados irregulares o puede haberse formado el cristal. En la Figura 2.4 se muestra un diagrama esquemático de fases para este proceso.

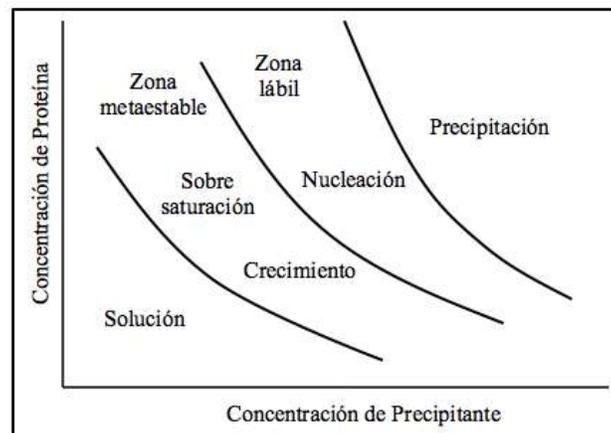


FIGURA 2.4 Diagrama esquemático de fases de una mezcla de proteína y solución precipitante. (Adaptado de Jena Biosciences, 2015)

Para formar el cristal es necesario el cambio de la concentración de la proteína y del precipitante para salir de la zona en que la proteína está en solución (Figura 2.4) pero sin llegar a la zona en que la proteína precipita, se debe llegar hasta la zona de la nucleación para que se inicie la formación del cristal y cambiar a la zona de crecimiento para que sea sólo un cristal el que llegue al tamaño adecuado.

El pH del amortiguador utilizado, por sí mismo, puede hacer que la proteína solubilice o precipite si éste se encuentra en el punto isoeléctrico; los solventes y polímeros orgánicos (Tabla 2.1) disminuyen la solubilidad de la proteína porque bajan la constante dieléctrica de la solución, hacen que la interacción entre moléculas de proteínas y entre el solvente y la proteína vaya cambiando y obligue a la proteína a precipitar, preferentemente en forma de cristales. Las sales también participan en la interacción entre las moléculas porque cambian la carga iónica de la solución, en cierto punto las cargas de la superficie de las proteínas interactúan mejor con su entorno y se encuentran solubilizadas, después de un tiempo las cargas del precipitante entran en competencia por las moléculas de agua con las cargas de la superficie de las proteínas y viene la precipitación. (Jena Biosciences, 2015)

TABLA 2.1 Algunos componentes de la solución precipitante (Tomado de diversos kits de Jena Biosciences, Hampton Research y Molecular Dimensions para cristalización de proteínas).

Precipitante	Sales y aditivos	Amortiguador
Polietilén glicol Sulfato de amonio Alcoholes Formiato de sodio Glicerol Dioxano	Divalentes Halogenadas Nitrato, Fosfato, Sulfato Alcoholes Monosacáridos Ácidos carboxílicos Aminoácidos	Imidazol MES HEPES MOPS Tris Bicina

El cristal de proteína se construye a partir de enlaces iónicos por interacciones coulombicas. La proteína en solución posee una carga debida al pH del amortiguador en que se encuentra, en relación con su valor de  $pI$ . Los iones de la solución precipitante neutralizan las cargas de la proteína según los distintos grupos funcionales que posea y su valor de  $pKa$ . Una molécula de proteína que se ha neutralizado por la acción de los enlaces iónicos puede precipitar y pasar a la fase sólida para la formación del cristal. La orientación ordenada del cristal depende del arreglo ideal entre las proteínas y los iones. (Ostwald., *et al* 2017)

Los cristales de proteínas tienen una composición y cinética de crecimiento diferente de los cristales inorgánicos. Están constituidos por: (a) moléculas de proteínas colocadas en planos regulares formando una red parecida a una malla, (b) agua ligada, entre 1 y 1.5 %, que recubre la superficie de los grandes canales formados entre las proteínas en red, en forma similar a un enlace y que son lo suficientemente regulares como para ser identificadas por difracción de rayos X y (c) agua libre, entre 35 y 45 %, que llena el interior de los canales y que contiene precipitantes, sales, aditivos y amortiguadores. (Rosenberger, 1986; Ostwald., *et al* 2017)

### 2.2.1 Métodos de cristalización de proteínas

Los métodos más usados para la cristalización de proteínas operan por difusión de vapor y son tres: gota colgante, gota apoyada y microlote. La solución proteica (de 10 a 20 mg/mL de proteína pura) se mezcla con la solución precipitante, generalmente en partes iguales y para dar un volumen final de 2 a 10  $\mu\text{L}$ . De la solución reservorio se colocan de 500 a 1000  $\mu\text{L}$ .

La principal diferencia entre estas tres técnicas es la velocidad en que ocurre la difusión de vapor, como puede verse en la Figura 2.5, donde la solución reservorio se encuentra al fondo de la celda y la solución precipitante mezclada con la solución proteica se encuentran en forma de gota. La técnica de microlote no lleva solución reservorio, la gota de solución precipitante más solución proteica es cubierta con una capa de parafina.

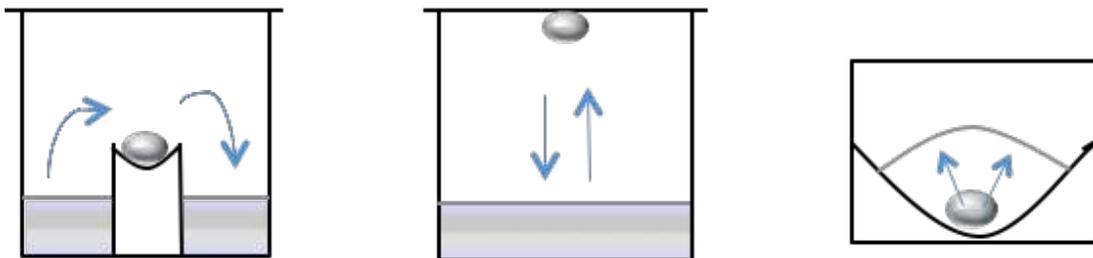


FIGURA 2.5 Técnicas para cristalización de proteínas. De izquierda a derecha: gota apoyada, gota colgante y microlote.

La difusión de vapor para alcanzar el equilibrio es más rápida en la gota colgante que en la gota apoyada, debido a la cercanía de la solución reservorio y al área expuesta de la gota colgante. En el microlote la parafina no es un aislante, es un material higroscópico y va cambiando la concentración de la proteína con respecto al tiempo en esas condiciones constantes de presión y temperatura. (Dr. Enrique Rudiño Piñera, comunicación personal)

## **2.3 Purificación de proteínas**

Son varios los procesos que se emplean en la purificación de proteínas, un paso es la precipitación por medio de sales, solventes orgánicos, amortiguador a pH en el punto isoeléctrico o por efecto de la temperatura. Los siguientes pasos tienen que ver con protocolos de cromatografía: de afinidad, de intercambio iónico, de interacción hidrofóbica, covalente y de filtración en gel. Generalmente se reportan más de dos pasos de purificación para alcanzar la proteína pura a homogeneidad.

### **2.3.1 Métodos cromatográficos en la purificación de proteínas lipolíticas**

La purificación de las proteínas es una etapa fundamental en la obtención del cristal que será difractado. En este proceso la mayoría de las veces son usadas las columnas cromatográficas, especialmente cuando se trata de proteínas recombinantes a las que se ha añadido un péptido, generalmente de poli-histidinas, que puede adsorberse en iones de níquel o cadmio. Ejemplos de purificación de proteínas lipolíticas de microorganismos termófilos se presentan a continuación, con excepción de dos de ellas, todas fueron cristalizadas.

Manco *et al.* (2000), purificaron AFEST, una esterasa termofílica y termoestable, clonada mediante un derivado del vector pT7. El paquete celular (30 g) lo resuspendieron en 150 mL de amortiguador A, tomaron alícuotas de 40 mL e hicieron la lisis celular con una prensa francesa (1.38 MPa). Centrifugaron por 30 min a 4 °C a 8,000 x g, el sobrenadante lo calentaron para precipitar a 90 °C por 10 min, después lo centrifugaron por 30 min a 4 °C a 17,000 x g. El sobrenadante lo cargaron directamente en una columna de fenil sefarosa

equilibrada con el amortiguador con un 10% (p/v) de sulfato de amonio. Después de lavar, aplicaron un gradiente de 10 a 0 % de sulfato de amonio y colectaron las fracciones con actividad enzimática.

Hotta *et al.* (2002) purificaron una esterasa producida por el hipertermófilo *Pyrobaculum calidifontis* VA1 clonada con el vector pET-21a. El paquete celular lo resuspendieron en amortiguador Tris-HCl pH 8.0, 20 mM, después lo sometieron a pulsos ultrasónicos y centrifugaron a 10,000 x g por 20 min a 4 °C. El sobrenadante lo incubaron a 80 °C por 20 min y centrifugaron a 16,000 x g por 20 min a 4 °C. La fracción soluble la cargaron en una columna de intercambio iónico equilibrada con el mismo amortiguador y eluyeron con un gradiente de NaCl de 0 a 0.5 M. Las fracciones con actividad de esterasa fueron colectadas y concentradas usando una unidad de filtración centrífuga de Millipore. El concentrado fue cargado en una columna de filtración en gel Superdex 200 HR 10/30 en el mismo amortiguador con NaCl 0.1 M. Las fracciones colectadas fueron usadas como el extracto purificado.

Ewis *et al.* (2004) purificaron dos esterazas de *Geobacillus stearothermophilus*, Est30 y Est55 clonadas con el vector pBAD-HisA. Obtuvieron un paquete celular por centrifugación del medio de cultivo a 3,800 x g por 10 min a 4 °C que lavaron una vez con 40 mL de amortiguador Tris-HCl 10 mM pH 8.0, enseguida resuspendieron en el mismo amortiguador e hicieron la lisis celular con tres pasos por una prensa francesa a 1,000 psi. Centrifugaron a 6,000 x g por 15 min a 4 °C e incubaron el sobrenadante a 60 °C por 20 min. Centrifugaron a 12,000 x g por 20 min a 4 °C y el sobrenadante lo cargaron en una columna de Sepharose HR 26/10 equilibrada con Tris-HCl 50 mM pH 8.0, eluyeron con un gradiente de KCl. Las fracciones con actividad enzimática fueron colectadas y concentradas por ultrafiltración (Biomax-30; Millipore) antes de cargar en una columna de Sephacryl S200 HR 26/60 equilibrada con amortiguador de fosfato de potasio 50 mM pH 7.0 conteniendo NaCl 0.15 M. La proteína fue eluída con el mismo amortiguador a una velocidad de 0.5 mL/min.

En la purificación de la Est30 hicieron una modificación al protocolo, con experimentos preliminares descubrieron que la enzima era liberada por choque osmótico. El paquete celular fue resuspendido en 40 mL de solución hipertónica de Tris-HCl 20 mM pH 7.5 adicionada con EDTA 2.5 mM y 20 % de sacarosa. Las células se incubaron en hielo por 30 min con vortex cada 10 min, centrifugaron a 20,000 x g por 20 min a 4 °C y el paquete celular fue resuspendido en una solución hipotónica de Tris-HCl 20 mM pH 7.5 y EDTA 2.5 mM, incubada en hielo por 30 min con vortex cada 10 min. Centrifugaron a 22,000 x g por 20 min a 4 °C y el sobrenadante conteniendo a Est30 se purificó como fue descrito antes.

Rhee *et al.* (2005) purificaron una esterasa EstE1 obtenida de una biblioteca metagenómica, clonada con el vector pET-22b. El paquete celular lo resuspendieron en amortiguador A, lo sometieron a pulsos ultrasónicos, centrifugaron a 20,000 x g por 30 min, el sobrenadante lo incubaron a 80 °C por 10 min y después centrifugaron por 30 min a 4 °C. El sobrenadante fue incubado con una resina de agarosa-NTA, que previamente fue equilibrada con el amortiguador A, durante 2 h en baño de hielo. Después de lavar la columna, la esterasa fue eluída con un gradiente de imidazol de 50 a 450 mM. Las fracciones con actividad enzimática fueron dializadas con una columna de filtración en gel con amortiguador Tris-HCl pH 7.8 50 mM, NaCl 150mM, ditiotretitol 1 mM y EDTA 0.5 mM. Después la solución pasó por una columna de Sephacryl S-200HR con un flujo de 0.5 mL/min. Las fracciones colectadas fueron dializadas con el amortiguador A y purificadas y concentradas mediante una columna de Ni-NTA. Las proteínas adsorbidas fueron eluídas con un gradiente de imidazol de 50 a 450 mM en amortiguador A y dializadas con amortiguador de fosfato de potasio 50 mM a pH 7.0 con 10% de glicerol.

Montoro-García *et al.* (2009) purificaron una carboxilesterasa termoestable producida por *Geobacillus kaustophilus* HTA426 y clonada con el vector pET-28a. El paquete celular fue resuspendido en amortiguador de fosfatos pH 8.0, 50 mM, adicionado con inhibidor de proteasas. La ruptura celular se realizó en un homogeneizador por 15 min a 2,000 rpm y se

centrifugó a 4 °C, 6,000 x g por 20 min. Se agregaron 3 U/mL de DNAsa, se agitó lentamente por 30 min a temperatura ambiente y se centrifugó por 20 min a 6,000 x g a 4 °C. El sobrenadante se pasó por ultrafiltración tangencial con una membrana de corte nominal de peso molecular de 100 kDa y después por una columna de cromatografía de afinidad equilibrada con amortiguador de fosfatos 25 mM, NaCl 500 mM e imidazol 5 mM, pH 8.0. La enzima fue eluída con un gradiente entre 50 y 65 mM de imidazol a una velocidad de flujo de 0.5 mL/min.

Angkawidjaja *et al.* (2012) purificaron la esterasa Sto-Est producida por la arquea *Sulfolobus tokodaii* y clonada con el vector pET-28a. El paquete celular fue resuspendido en amortiguador Tris-HCl pH 9.0, 20 mM con imidazol 5 mM y NaCl 150 mM, lisado con prensa francesa y la fracción soluble fue cargada en una columna quelante HiTrap. La elución fue con un gradiente de imidazol de 0 a 500 mM. Las fracciones con actividad enzimática fueron colectadas y cargadas en una columna Superdex 200 HiLoad 16/60 equilibrada con amortiguador de Tris-HCl pH 9.0, 5 mM con NaCl 50 mM. Las fracciones con actividad enzimática fueron colectadas y conservadas a -30 °C hasta su uso.

Rengachari *et al.* (2012) purificaron a una monoacil glicerol lipasa producida por *Bacillus sp.* H-257 y clonada con el vector pET-28a. El paquete celular fue resuspendido en amortiguador Tris-HCl 20 mM pH 7.5 adicionado con NaCl 100mM y lisado por pulsos ultrasónicos. Centrifugaron a 22,000 x g por 30 min y el sobrenadante fue cargado en una columna de resina de agarosa Ni-NTA. La proteína fue eluída con el mismo amortiguador adicionado con imidazol 250 mM y fue dializada con el mismo amortiguador sin imidazol. La proteína fue concentrada y cargada en una columna Superdex 200 a un flujo de 0.5 mL/min.

Charbonneau *et al.* (2013) purificaron una carboxilesterasa EstGtA2 producida por *Geobacillus thermodenitrificans* CMB-A2 que clonaron con el vector pQE31. El paquete celular fue resuspendido en amortiguador de lisis (fosfato de sodio 50 mM, imidazol 10 mM,

NaCl 150 mM, lisozima 1 mg/mL pH 7.5) y sometido a pulsos ultrasónicos, centrifugaron por 30 min a 15,000 rpm, después usaron una columna de afinidad Ni-NTA de níquel a pH 8 usando imidazol como eluyente de la enzima. Después dializaron con cartuchos Slide-A-Lyzer dos veces, usando 2 L de amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 8, por 48 h a 4 °C.

En ningún caso los autores reportaron factores de purificación, algunos de ellos presentaron la electroforesis del gel de poliacrilamida para mostrar la presencia de la banda purificada. Para estos autores, la purificación fue un paso intermedio para el objetivo final de sus trabajos, ya sea la caracterización bioquímica de la enzima o la cristalización para la obtención de su estructura terciaria.

### **2.3.2 Uso de membranas en la purificación de proteínas no lipolíticas**

Existen otros métodos no cromatográficos que han sido estudiados en la purificación de proteínas, se basan en el proceso de ultrafiltración usando diferentes tipos de membranas. En este escenario, las variables que definen la purificación son aquellas relacionadas con las características tanto de la membrana como de la solución proteica. Además del tamaño molecular de corte nominal de la membrana, influyen también la carga y el carácter hidrofóbico o hidrofílico que posea; por cuanto hace a la proteína, además de su tamaño, influyen de manera importante el pH y fuerza iónica de la solución proteica. También es imprescindible conocer el punto isoeléctrico de la proteína de interés y predecir su carga en función del pH del amortiguador utilizado.

Las membranas que han sido usadas tradicionalmente han sido elaboradas de diversas matrices: polisulfona, polietersulfona y, más recientemente, de celulosa regenerada. El equipo de ultrafiltración consiste en una celda agitada y presurizada con gas inerte que hace pasar la solución proteica a través de la membrana mediante el flujo pistón. Alternativamente, se ha desarrollado el proceso de filtración en flujo tangencial de alto desempeño, donde a diferencia

del flujo pistón en la ultrafiltración, el flujo es tangencial y existe una pequeña contrapresión que impide la obstrucción o taponamiento de la membrana.

Diversos y numerosos estudios han sido publicados acerca de la purificación de proteínas en sistemas modelo mediante el uso de membranas. Suelen estudiarse sistemas con dos o tres proteínas de pesos moleculares y puntos isoeléctricos semejantes o relativamente cercanos para demostrar la eficiencia de las membranas en la separación de las proteínas involucradas. Para lograrlo, se realizan modificaciones a la membrana o se utilizan distintos amortiguadores de baja fuerza iónica, según el punto isoeléctrico de la proteína y según se desee que ésta permanezca en el retenido o pase al filtrado, más allá de sólo considerar el corte nominal de peso molecular que posea la membrana.

Saksena y Zidney (1994) publicaron la separación por ultrafiltración de albúmina de suero bovina (BSA) e inmunoglobulina G (IgG) usando membranas de polietersulfona de corte nominal de peso molecular de 100 y 300 kDa. Reportan la transmisión de BSA en un amortiguador de pH 4.8 con una selectividad de 50, por el contrario, cuando utilizaron el amortiguador a pH 7 la selectividad fue de 2, en ambos casos utilizaron la membrana de 100 kDa, atribuyen la diferencia a que el punto isoeléctrico de BSA es 4.7; en otro experimento con la membrana de 300 kDa, usando un amortiguador de pH 7.4, hallaron que la selectividad fue inversa para la transmisión de IgG (pI 7.0). A pesar de que el corte nominal de peso molecular de la membrana permitiría el paso de ambas proteínas, debido al pH usado, se retuvo la BSA.

Van Reiss *et al.* (1999) publicaron el uso de filtración en flujo tangencial de alto desempeño para la separación de albúmina de suero bovino (BSA) y el fragmento de enlace del antígeno de un anticuerpo de DNA recombinante (Fab). Usaron una membrana de polietersulfona de corte nominal de peso molecular de 100 kDa e hicieron modificaciones a la membrana para que esta adquiriera carga positiva y negativa en cada caso. Cuando usaron el amortiguador en el punto isoeléctrico de Fab (8.5), ésta pasó en el filtrado y BSA adquirió

carga negativa. La retención o transmisión de BSA fue determinada por la carga de la membrana, cuando ésta fue negativa, la BSA se retuvo, y cuando la membrana fue positiva, la BSA pasó en el filtrado. Resultados inversos se obtuvieron cuando usaron el amortiguador en el punto isoeléctrico de BSA. Nótese que los autores usaron una baja concentración de proteína (3 mg/mL) y baja fuerza iónica del amortiguador (10 mM), factores que en otras ocasiones han sido reportados como determinantes en el taponamiento de las membranas de ultrafiltración, sin embargo en este caso, el taponamiento fue reducido por el uso del flujo tangencial.

Arunkumar y Etzel (2013) publicaron un estudio de la selectividad en filtración en flujo tangencial en la separación de  $\alpha$ -lactoalbúmina y  $\beta$ -lactoglobulina, proteínas que poseen tamaños y puntos isoeléctricos muy cercanos entre sí. Utilizaron una membrana de celulosa regenerada de 300 kDa, que modificaron para conferirle una carga positiva. La solución proteica tenía el pH 4.3, cercano al punto isoeléctrico de  $\alpha$ -lactoalbúmina, que pasó al filtrado, mientras que  $\beta$ -lactoglobulina se quedó en el retenido cuando adquirió una carga igual a la de la membrana en ese valor de pH del amortiguador.

Hadidi y Zydney (2014) publicaron, un estudio acerca de la obstrucción o taponamiento debido a interacciones electrostáticas e hidrofóbicas entre la membrana y las proteínas, usando ultrafiltración en celda agitada. Utilizaron una membrana de celulosa regenerada de corte nominal de peso molecular de 100 kDa, que modificaron químicamente para que adquiriera un carácter zwitteriónico, básico, ácido, hidrofílico, hidrofóbico y con una fuerte carga negativa en cada caso. Usaron una mezcla de proteínas a una concentración de 5 mg/mL. El tratamiento que menos obstrucción produjo fue el zwitteriónico. Fueron cuatro proteínas utilizadas en el estudio, y sólo una era de tamaño molecular superior al corte nominal de la membrana, utilizaron también tres valores de pH (5, 7 y 9) para la solución proteica, que a su vez coincidían con los puntos isoeléctricos de las proteínas excepto para el de la proteína más grande. No reportan valores de selectividad.

## 2.4 Estructura terciaria de carboxilesterasas de microorganismos termófilos: estado del arte

De Simone *et al.* (2001) presentaron la estructura tridimensional de AFEST (PDB: 1JJI), una enzima de 35.5 kDa, clasificada como lipasa sensible a hormonas (HSL), que a pH 7.1 y 70 °C hidrolizó mejor a *p*-nitro fenil caproato. El cristal fue obtenido después de dos semanas, por difusión de vapor por gota colgante a 22 °C, a partir de una solución de proteína pura en amortiguador Tris-HCl 25 mM (pH 8.3), MgCl<sub>2</sub> 2.5 mM y EDTA 0.5 mM y concentrada a 8 mg/mL. Los cristales obtenidos fueron de 0.3 mm x 0.3 mm x 0.4 mm a partir de gotas que contenían 3 µL de la solución proteica y 3 µL de la solución precipitante (PEG 4000 15% (p/v), acetato de magnesio 0.3 M, amortiguador Na-Hepes 0.1 M, pH 7.5). La estructura obtenida por difracción de rayos X tiene una resolución de 2.20 Å y el refinamiento se hizo por reemplazo molecular, el cristal pertenece al grupo espacial P6<sub>2</sub>. AFEST es producida por el termófilo *Archaeoglobus fulgidus* cuya temperatura óptima de crecimiento es 83 °C. Los autores reportan que la principal razón de la estabilidad de AFEST en altas temperaturas es por la reducción de regiones de giros en comparación con sus contrapartes mesofílicas. Detectaron la eliminación de doce residuos entre las α<sub>2</sub> y α<sub>3</sub>, tres residuos entre β<sub>2</sub> y β<sub>3</sub>, dos residuos entre β<sub>3</sub> y α<sub>4</sub>, cuatro residuos entre β<sub>4</sub> y α<sub>5</sub>, nueve residuos entre β<sub>6</sub> y α<sub>8</sub> y tres residuos entre α<sub>9</sub> y β<sub>7</sub>.

Liu *et al.* (2004) publicaron la estructura tridimensional de Est30 (PDB: 1TQH), una esterasa producida por *Geobacillus stearothermophilus*, de 28.3 kDa, que a pH 9 y 70 °C hidroliza mejor el *p*-nitro fenil caproato. El cristal fue obtenido por difusión de vapor en gota colgante a 24 °C a partir de una solución de 4.6 mg/mL de proteína pura usando 1 µL de solución proteica y 1 µL de solución precipitante, que contenía sulfato de litio 70 % (p/v), PEG 400 5 % (p/v), dioxano 5 % y amortiguador HEPES 100 mM a pH 7.5. La estructura fue obtenida por difracción de rayos X con una resolución de 1.63 Å y el refinamiento fue por dispersión anómala múltiple. Indicaron que la enzima posee dos dominios, uno que ensambla

el plegamiento  $\alpha/\beta$  hidrolasa y otro formado por tres hélices que ensamblan una tapa adyacente al sitio activo.

De Simone *et al.* (2004) publicaron la estructura tridimensional de EST2 mutante (PDB: 1EVQ y 1U4N), una enzima producida por *Alicyclobacillus acidocaldarius* de 34.9 kDa y 310 aminoácidos. La enzima es considerada como lipasa sensible a hormonas (HSL) y a 70 °C hidroliza mejor el *p*-nitro fenil con cadena lateral de C:6 a C:8. La enzima fue cristalizada por el método de la gota colgante a 22 °C, colocando 4  $\mu$ L de solución proteica (8 mg/mL) y 4  $\mu$ L de solución precipitante (sulfato de amonio 2 M, HEPES 100 mM pH 7.8, PEG 400 al 2 % y DTT 1 mM). La estructura obtenida por difracción de rayos X tuvo una resolución de 2.10 Å y su refinamiento fue por reemplazo molecular.

Byun *et al.* (2007) publicaron la estructura tridimensional de la enzima EstE1 (PDB: 2C7B) obtenida de una biblioteca metagenómica de un ambiente termal. Es considerada como lipasa sensible a hormonas, de 34 kDa y 311 aminoácidos, que a pH 6 y 95 °C hidroliza mejor el *p*-nitro fenil caproato; no se registró actividad lipolítica por arriba de C:10. Fue cristalizada por el método de la gota colgante a partir de una solución de 10 mg/mL de proteína colocando 1.5 mL de esta solución y 1.5 mL de solución precipitante (Bis-Tris 0.1 M, sulfato de amonio 0.2 M, sulfato de litio 1 M a pH 6.5). Se trata de un dímero termoestable cuya estructura fue obtenida por difracción de rayos X con una resolución de 2.1 Å y el refinamiento fue hecho por dispersión anómala simple, el grupo espacial es al P41212 y las dimensiones de la celda unitaria son  $a=b=73.71$  Å,  $c=234.23$  Å y  $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$ . En esta investigación también reportan experimentos de dicroísmo circular para estudiar los perfiles de desnaturalización térmica de la enzima nativa y ocho mutantes y concluyen que la principal razón de su termoestabilidad es por la dimerización por interacciones hidrofóbicas.

Liu *et al.* (2007) publicaron la estructura tridimensional de Est55 (PDB: 2OGT y 2OGS), enzima producida por *Geobacillus stearothermophilus*, de 54.8 kDa y 498

aminoácidos, que a 60 °C y pH 8.5 hidroliza mejor el *p*-nitro fenil caproato. Después de dos semanas obtuvieron dos cristales por gota colgante a 24 °C colocando 1 μL de solución proteica y 1 μL de solución precipitante (PEG 3350 al 20% (p/v), yoduro de amonio 0.2 M para el pH 6.2 o yoduro de potasio 0.2 M para el pH 6.8), ambos fueron difractados por rayos X. El cristal que fue hecho a pH 6.2 alcanzó una resolución de 2.02 Å, el otro cristal obtenido a pH 6.8 tuvo una resolución de 1.58 Å. En ambos casos la estructura fue refinada por reemplazo molecular.

Palm *et al.* (2011) publicaron la estructura de PestE (PDB: 3ZWQ), una enzima producida por *Pyrobaculum calidifontis* VA1. Se trata de una enzima de 34 kDa y 313 aminoácidos que a pH 7 y 90 °C hidroliza mejor el *p*-nitro fenil caproato, es considerada una lipasa sensible a hormonas. El cristal fue obtenido por difusión de vapor en gota apoyada a 20 °C utilizando una solución de la proteína pura a 10 mg/mL. En los ensayos preliminares para dar con la condición de cristalización reportan el uso del robot de cristalización (HTPC, CyBio, Jena, Alemania) en placas Crystal Quick LP de Greiner Bio-One, con volúmenes iguales de solución de proteína y solución precipitante (0.3 μL) y 40 μL de solución reservorio; para crecer el cristal en la condición elegida utilizaron 2 μL de solución de proteína/solución precipitante y 500 μL de solución reservorio, (2-metil-2,4-pentanediol (MPD) al 30 %, PEG 6000 al 10 % y acetato de sodio 0.1 M). La estructura fue obtenida por difracción de rayos X con una resolución de 2.0 Å y fue refinada por reemplazo molecular. El grupo espacial es P21212 y los parámetros de la celda unitaria son  $a= 61.92 \text{ \AA}$   $b= 127.27 \text{ \AA}$   $c= 93.73 \text{ \AA}$   $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$ .

Angkawidjaja *et al.* (2012) publicaron la resolución de la estructura tridimensional de Sto-Est (PDB: 3AIK), una enzima producida por *Sulfolobus tokodaii*, considerada como lipasa sensible a hormonas, de 37.8 kDa y 323 aminoácidos, que a 60 °C y pH 6.0 hidrolizó mejor el *p*-nitro fenil caprilato. Por medio de la difusión de vapor por gota apoyada obtuvieron un cristal utilizando una condición de la malla Crystal Screen II de Emerald Biosystems (Tris/

HCl 0.1M, pH 8.5, fosfato de amonio monobásico 0.2 M y MPD al 50 %). La estructura fue obtenida por difracción de rayos X con una resolución de 1.95 Å y fue refinada por reemplazo molecular. El grupo espacial es P21 y las dimensiones de la celda unitaria son  $a=76.33$  Å,  $b=114.75$  Å,  $c=102.21$  Å y  $\beta=108.84^\circ$ . La enzima es un dímero termoestable, los autores hicieron la mutación del residuo 267 con tres aminoácidos diferentes, cristalizaron y resolvieron las tres estructuras, que resultaron similares a la enzima original, salvo ligeras diferencias en las coordenadas atómicas; en la caracterización de las mutantes todas fueron inestables comparadas con la enzima original. También hicieron experimentos de dicroísmo circular en el UV lejano para estudiar la desnaturalización tanto de la nativa como de las mutantes, los espectros de desnaturalización fueron similares, reportan que el mayor efecto en la desnaturalización se debe al pH, siendo la máxima estabilidad entre 7 y 9.

Rengachari *et al.* (2012 y 2013) presentaron el estudio de la estructura tridimensional de bMGL (PDB: 3RM3), enzima producida por *Bacillus* sp. H-257 de 29.7 kDa y 270 aminoácidos, que tiene una identidad de 99% con CaesCCR11. Esta enzima fue clonada con una cola de histidinas, es considerada una mono acil glicerol lipasa, que a 75 °C y en un rango de pH de 6 a 8 hidroliza mejor el mono lauroil glicerol. El cristal fue obtenido por difusión de vapor en gota apoyada a 20 °C utilizando una condición de la malla de cristalización Morpheus Screen, partiendo de una solución de 20 mg/mL de proteína pura.

La solución precipitante contiene amortiguador 0.1 M MES/imidazol pH 6.5, polietilén glicol 3350 al 12.5 % (p/v), MPD (2-Methyl-2,4-pentanediol) al 12.5 % (p/v) y una mezcla 0.12 M de monosacáridos (D-glucosa, D-manosa, D-galactosa, L-fructosa, D-xilosa y N-acetil-D-glucosamina). Un cristal de la enzima purificada fue difractado por rayos X con una resolución de 1.2 Å (PDB: 3RM3). Para reconocer la inactivación de la enzima en su sitio activo, otro cristal de la enzima fue sumergido en una solución de PMSF 250 mM por 90 min. La difracción de este cristal se obtuvo con una resolución de 1.8 Å, en ambos casos la estructura fue refinada por reemplazo molecular. Posteriormente, en 2013, prepararon una

mezcla de la enzima 0.9 mM con sustratos sintéticos 45 mM (C:12, C:14, C:16, mono-lauroil glicerol y mono-octanoil glicerol), incubaron por una hora a 4°C y obtuvieron los cristales después de dos semanas. Las estructuras obtenidas por difracción de rayos X tienen una resolución de 1.7 a 2.8 Å y fueron refinadas por reemplazo molecular.

Sayer *et al.* (2015) clonaron, sobreexpresaron, purificaron y caracterizaron una carboxilesterasa de *Thermogutta terrifontis* a la que denominaron TtEst, que hidrolizó mejor el *p*-nitrofenil propionato y conservó el 95 % de su actividad después de haber sido incubada por 1 h a 80 °C. El cristal fue obtenido a 20 °C en amortiguador de HEPES 50 mM pH 7.5 con PEG 600 al 18 % con la proteína concentrada a 15 mg/mL. El grupo espacial es P3221 y las dimensiones de la celda unitaria son  $a=b=43.3$  Å,  $c=227.1$  Å y  $\alpha=\beta=90^\circ$  y  $\gamma=120^\circ$ . La estructura fue obtenida a una resolución de 1.2 Å y fue refinada por reemplazo molecular.

Rangel-Pereira *et al.* (2017) publicaron la resolución de la estructura de Est8, una esterasa alcalina obtenida de una muestra metagenómica. La enzima es de 37 kDa y pertenece a la familia IV de carboxilesterasas (HSL), hidrolizó el *p*-nitro fenil acetato a 30 °C y pH 9. Los cristales fueron obtenidos a 18 °C con la solución de proteína pura a 17.8 mg /mL y la solución precipitante compuesta por amortiguador MES a pH 7.5, PEG 8000 al 1 % y acetato de triamonio 1.4 M. El cristal pertenece al grupo espacial P3121. La estructura fue resuelta a 1.85 Å, y refinada por reemplazo molecular partiendo de la estructura de una carboxilesterasa de *Alicyclobacillus acidocaldarius*.

## **2.5 Antecedentes directos de este trabajo**

La línea de estudio del grupo de trabajo del Laboratorio de Bioquímica de la UNIDA-ITV se presenta a continuación: Rodríguez-Gómez, C. (2002) aisló el microorganismo termófilo *Geobacillus thermoleovorans* CCR11 de las aguas termales “El Carrizal”, Veracruz y encontró que tenía actividad lipolítica cuando fue cultivado en medio con rodamina. Castro-Ochoa *et al.* (2005) purificaron y caracterizaron una lipasa producida por *G. thermoleovorans*

CCR11 en forma nativa, de peso molecular de 11 kDa y con actividad máxima en *p*-nitro fenol caprato (C10); con este sustrato se determinaron condiciones óptimas en pH 9.0 a 10.0, y temperatura de 60 °C. Sales de Ca<sup>2+</sup> y Tritón X-100 incrementaron su actividad. Fue estable en solventes orgánicos como acetona, metanol, etanol y 2-propanol, excepto en butanol. Fue notable su capacidad para formar agregados.

Quintana-Castro *et al.* (2008) obtuvieron cuatro construcciones genéticas para una lipasa de *G. thermoleovorans* CCR11 de 43 kDa (LipCCR11, LipACCR11, LipMatCCR11 y LipProCCR11). Todas fueron clonadas en cepas de *E. coli* usando cuatro vectores diferentes. Estas enzimas mostraron distintas condiciones para la actividad óptima: el pH se ubicó entre 8.0 y 9.0, la temperatura entre 30 y 50 °C y la especificidad del sustrato (cadenas acil de *p*-nitro fenol) fue distinta en cada caso (C:8, C:10, C:14, y C:16). Estas variaciones fueron atribuidas a modificaciones estructurales, producto de las proteínas de fusión, que fueron agregadas para efectos de purificación, y al péptido señal, al que *E. coli* puede no reconocer o cortar. Se sugirió también que *E. coli* podía no ser capaz de plegar la enzima apropiadamente, debido en parte a la alta concentración de proteína obtenida. Estos autores compararon las propiedades bioquímicas con la enzima reportada por Castro-Ochoa *et al.* (2005), y encontraron que fue similar a la construcción LipProCCR11, que incluía el promotor del gen de la cepa original; también fue la que menos se expresó por las razones estructurales antes citadas.

Sánchez-Otero *et al.* (2010) estudiaron reacciones catalizadas con LipMatCCR11, sintetizaron *n*-butil caproato por alcoholisis de etil caproato y butanol, y por acidólisis de butirato de butilo y ácido caproico, alcanzando porcentajes de conversión superiores al 63 % cuando se usó hexano o xileno como medio de reacción.

En su tesis doctoral, Sánchez-Otero (2011) mejoró el medio de cultivo de inducción de actividad lipolítica usado para *G. thermoleovorans* CCR11, para la producción de una enzima

de 27 kDa. Usando este nuevo medio de cultivo logró aumentar la expresión de esta enzima y purificarla parcialmente. Determinó su actividad máxima con *p*-nitro fenol laurato y con este sustrato encontró las condiciones óptimas a pH 10.0 y 60°C. Una muestra de esta enzima fue analizada por espectrometría de masas de alta resolución en el Laboratorio Universitario de Proteómica del Instituto de Biotecnología de la UNAM y se reportó la presencia del péptido TPTASLLQLTR, que coincidió con una acil glicerol lipasa de 27.3 kDa de *G. kaustophilus* HTA426 (Gene Bank YP\_147678.1), constituyendo este hallazgo el punto de partida para el trabajo de investigación de Espinosa-Luna (2013), que considerando la secuencia de nucleótidos del péptido, clonó y sobreexpresó esta enzima nativa de *G. thermoloevorans* CCR11 mediante el vector de expresión pET-3b y el huésped *E. coli* BL21 denominándola CaesCCR11.

Espinosa-Luna (2013) encontró que CaesCCR11 tiene actividad arriba de 50 °C y que ésta es incrementada cuando se incuba a pH 9.0 y a una temperatura de 60 °C, por 20 min. Esta enzima hidrolizó el *p*-nitro fenil butirato, con mejores resultados que los ésteres de los ácidos de cadena larga. Se observó también que la actividad de la enzima se inhibe con fenil metil sulfonil fluoruro (PMSF), que es indicador de la presencia de serina en la triada catalítica del sitio activo, característica de las enzimas lipolíticas del grupo de  $\alpha/\beta$ -hidrolasas. Para estimar el uso potencial de CaesCCR11 en biocatálisis, se examinó su estabilidad en solventes orgánicos y se observó una tendencia a tolerar aquéllos que son no polares.

Se hizo el análisis de la estructura de CaesCCR11 a partir de la secuenciación del gen amplificado y su traducción a aminoácidos, reportando un tamaño de 27 kDa y un *pI* de 5.31, con un contenido de residuos aminoácidos hidrofóbicos superior al 50 %, así como una composición mixta de giros, hojas- $\beta$  y hélices- $\alpha$ , y una estructura monomérica. Esto último pudo comprobarse experimentalmente ya que su actividad no se inhibió en presencia de  $\beta$ -mercaptoetanol, compuesto que rompe los enlaces disulfuro en las proteínas multiméricas. Finalmente, se estableció su relación filogenética con otras lipasas y carboxilesterasas y se

halló diferencia filogenética con la lipasa de 43 kDa reportada por Quintana-Castro *et al.* (2008) evidenciando por un lado la producción de más de una enzima lipolítica por parte de *G. thermoleovorans* CCR11 y por otro, la cercanía con otras enzimas reportadas (Charbonneau *et al.*, 2010; Imamura y Kitaura, 2000) las cuales constituyen filogenéticamente la nueva familia de carboxilesterasas, de acuerdo con la clasificación propuesta por Arpigny y Jaeger en 1999.

La importancia de purificar a CaesCCR11 radica en la posibilidad de obtener suficiente proteína adecuada en cantidad y pureza para proceder a la cristalización, y una vez logrado el cristal poder utilizar la difracción de electrones o de rayos X para conseguir el patrón de difracción y elucidar la estructura terciaria que contribuya a la descripción estructural de las enzimas pertenecientes a la nueva familia XV.

## **JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS**

### **3.1 Justificación**

CaesCCR11 es una enzima termoalcalófila, estable y bioactiva en solventes orgánicos, que ha sido clonada, sobre-expresada y caracterizada. La ultrafiltración por membranas es una alternativa para lograr factores de purificación que permitan obtener cristales con características adecuadas para la determinación de la estructura terciaria de la enzima mediante difracción de electrones. Ambos procesos no han sido aplicados para este fin.

### **3.2 Hipótesis**

La elucidación de la estructura terciaria de CaesCCR11 permitirá confirmar su pertenencia a la nueva familia de carboxilesterasas.

## **OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo General**

Profundizar en el conocimiento bioquímico y estructural de la esterasa (CaesCCR11) producida por *Geobacillus thermoleovorans* CCR11.

#### **4.1.1 Objetivos Específicos**

- Obtener la enzima CaesCCR11 con la pureza y la cantidad necesaria para realizar la cristalización
- Obtener un cristal del tamaño apropiado para determinar la estructura terciaria
- Elucidar la estructura terciaria de CaesCCR11.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Microorganismos y reactivos

La enzima utilizada en este trabajo fue producida en forma recombinante a partir de una cepa transformada de *Escherichia coli* BL21 (DE3) con el vector de expresión *pET-3b*, que además de tener resistencia a ampicilina y el promotor T7 inducible con IPTG, contiene el gen *caesccr11*, que expresa una carboxilesterasa nativa en *Geobacillus thermoleovorans* CCR11.

Se utilizó la cepa nativa *G. thermoleovorans* CCR11 para obtener su ADN genómico y verificar la amplificación de los genes *duf* y *caes* por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que presumiblemente se encuentran en operón. La cepa nativa también fue empleada para expresar la CaesCCR11 por inducción en medio de cultivo con aceite de oliva y mediante choque térmico, y por la recuperación del paquete celular, verificar su expresión intracelular. Así mismo, se utilizó el medio de inducción de actividad lipolítica para extraer el ARN mensajero, convertirlo a ADN complementario y verificar por PCR la presencia de ambos genes en operón.

Los componentes de los medios de cultivo y reactivos utilizados fueron de las compañías Sigma-Aldrich, Bioxon, J. T. Baker, y Promega. Las membranas de ultrafiltración fueron de Millipore. Los kits de cristalización fueron de Hampton Research, Jena Biosciences y Molecular Dimensions. El acetato de uranilo fue un obsequio de la Dra. Guadalupe Zavala Padilla del Instituto de Biotecnología-UNAM. Las rejillas de cobre con recubrimiento de carbono para microscopía electrónica fueron de Electron Microscopy Sciences. Los kits de extracción de ARN y transcripción a ADN fueron de Thermo Scientific.

## 5.2 Técnicas analíticas

### 5.2.1 Determinación cuantitativa de la actividad enzimática

Se utilizó la técnica reportada por Nawani *et al.* (1998) para determinar la actividad lipolítica de la enzima como sigue: se preparó una mezcla de reacción con 0.40 mL de amortiguador de fosfato de potasio 0.05 M, pH 6.5, más 0.05 mL de muestra de enzima (a la dilución apropiada) y 0.05 mL de *p*-nitro fenil laurato 0.01 M en etanol absoluto. Se incubó por 30 min a 60 °C y se paró la reacción con 0.125 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.1 M, se centrifugó a 16,000 x g durante 15 minutos a 25 °C y al sobrenadante se le midió la absorbancia a 405 nm en un espectrofotómetro de microplacas StatFax. Se utilizó como blanco un tubo con todos los componentes excepto la enzima, en remplazo se agregó 0.05 mL de amortiguador. Se colocaron los ensayos por triplicado.

La actividad enzimática se calculó de acuerdo al coeficiente de extinción molar (Apéndice C) del *p*-nitro fenol a 405 nm ( $1.1591 \times 10^{-6} \mu\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ). Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima que libera 1  $\mu\text{M}$  de *p*-nitro fenol en 30 min bajo las condiciones de ensayo. La ecuación se muestra enseguida:

$$\frac{U}{\text{mL}} = \frac{\text{Abs}_{405}}{(1.1591 \times 10^{-6} \mu\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1})(1 \text{ cm})(0.625 \text{ mL})} * (\text{dilución})^{-1}$$

### 5.2.2 Cuantificación de proteína

#### 5.2.2.1 Método de Bradford

La concentración de proteína se determinó por el método de Bradford (1976) como sigue: se colocó 5  $\mu\text{L}$  de muestra (a la dilución apropiada) en el pozo de una micro placa de 8x12, de fondo plano, y se agregó 250  $\mu\text{L}$  de reactivo de Bradford (Sigma), se preparó además el pozo para el blanco en la posición A1 con el amortiguador utilizado en la dilución de la muestra. Se tomó el tiempo de incubación de 5 minutos a partir de la colocación del reactivo de Bradford al pozo considerado blanco, se continuó colocando el reactivo a los pozos con las

muestras, al término se agitó por 45 s toda la placa antes de concluir los 5 min. Pasado este tiempo se leyó la absorbancia a 595 nm. Para el cálculo de la concentración de proteína se utilizó una curva estándar (Apéndice A) con albúmina sérica bovina a concentraciones de 0, 0.2, 0.4, 0.6 y 0.8 mg/mL en amortiguador de fosfato de potasio 0.05 M pH 7.0

#### **5.2.2.2 Determinación espectrofotométrica absorbancia UV**

La concentración de la proteína en su etapa final de purificación se determinó con el espectrofotómetro Nanodrop (Thermo Scientific) de la siguiente manera: se colocó 1  $\mu$ L de la solución de proteína purificada directamente en el lector del espectrofotómetro, se leyó la absorbancia a 280 nm utilizando el coeficiente de extinción molar ( $25,460 \mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) y el peso molecular (27.31 kDa), calculados *in silico* (Espinosa-Luna *et al.*, 2016) para CaesCCR11 a partir de la secuencia de aminoácidos. Se utilizó como blanco el amortiguador en el que está diluida la proteína.

#### **5.2.3 Electroforesis en mini gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)**

Se utilizó la electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones disociantes para separar y analizar el patrón de bandas de las proteínas presentes desde el extracto crudo y durante las etapas de purificación. Los geles se prepararon a una concentración del 12% en condiciones disociantes, de acuerdo con la técnica reportada por Laemmli (1970), misma que se describe en el Apéndice B. La corrida se realizó a 15 mA constantes durante el tiempo necesario para que el frente se acercara sin salirse al final del gel de resolución. Los geles se tiñeron con Azul de Coomasie.

La muestra proteica se preparó en condiciones disociantes agregando el amortiguador de la muestra estandarizando la cantidad de proteína para cada carril, calentando por 4 min a  $95^{\circ}\text{C}$  y enfriando en hielo por 1 min antes de colocarla en el gel.

### **5.2.3.1 Actividad lipolítica *in situ* (zimograma)**

La identificación de la actividad lipolítica de las bandas de proteínas *in situ* se realizó con la técnica reportada por Prim *et al.* (2004) como sigue: el gel de poliacrilamida recién corrido fue enjuagado con agua destilada, incubado en Tritón X-100 al 2.5% (v/v) en solución acuosa durante 30 min, lavado dos veces por 20 min con amortiguador de fosfato de potasio 0.05 M pH 7.0, incubado con la solución de sustrato compuesta por 10 mL de amortiguador de fosfato de potasio 0.05 M pH 7.0 más 200  $\mu$ L de MUF-butirato 25 mM en solución de etilenglicol monometiléter, durante 2 min. Todo realizado en agitación oscilante y a temperatura ambiente. Al término se colocó el gel bajo luz UV, la banda fluorescente indicó la banda de proteína con actividad lipolítica.

### **5.2.4 Determinación del punto isoeléctrico de proteínas del extracto crudo mediante**

#### **Rotofor**

La solución cargada en el Rotofor (BioRad) (60 mL) se compuso de 1 mg de proteína total del extracto crudo, 1.5 % (v/v) de anfolitas Bio-Lyte pH 3-10 (BioRad) y 0.2 % (v/v) de Tritón X-100 en amortiguador de acetato de sodio 0.01 M a pH 5.3. El experimento se realizó a 12 W de potencia constante y terminó cuando el valor del voltaje fue constante por 30 min. El voltaje aumentará si el equipo no está correctamente enfriado. Se eliminó cualquier burbuja presente en los compartimentos.

A las fracciones colectadas se les determinó el pH con tiras reactivas (el volumen recuperado fue insuficiente para ser leído con el electrodo del potenciómetro). Las fracciones fueron cargadas en un mini gel de poliacrilamida en condiciones disociantes al 12 % para identificar la presencia de CaesCCR11 en las fracciones colectadas.

### **5.2.5 Determinación de tamaño de partícula**

Se utilizó un equipo Zetasizer Nano ZS90 de Malvern, con una dispersión de luz dinámica a 90° utilizando un rayo láser de atenuación automática a 632.8 nm y un detector de

fotodiodo. El tamaño promedio de partícula se determinó con el Zetasizer Nano Software (version 7.11). Se colocó una muestra de 20  $\mu\text{L}$  con una concentración máxima de proteína de 10 mg/mL y se agregó 1 mL de agua desionizada como agente dispersante, previniendo la formación de burbujas. La muestra se colocó en celdas de plástico desechables, se estabilizó por 3 min a 25 °C, se estableció el atenuador y el número de corridas en automático y se leyó por triplicado. Cuando la concentración de proteína fue de 1 mg/mL la muestra no se diluyó, se colocó 1 mL completo en la celda.

### **5.2.6 Micrografías de microscopía electrónica de transmisión**

Las micrografías se obtuvieron en un microscopio electrónico de transmisión JEM 1400 Plus de la marca JEOL con tinción negativa. Las muestras se prepararon como sigue: en una caja Petri grande se colocó una lámina de papel Parafilm, en ella se acomodó en forma separada una gota de 10  $\mu\text{L}$  con la muestra y dos gotas de acetato de uranilo al 2 % (v/v) de 10  $\mu\text{L}$  cada una. Esta metodología fue sugerida por la Dra. Guadalupe Zavala Padilla del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

La rejilla de 300 mallas de cobre recubierta de carbono (Electron Microscopy Sciences) se tomó con las pinzas y se depositó por 1 min con la cubierta de carbono de cara a la gota con la muestra, pasado 1 minuto se colocó momentáneamente en la primera gota de acetato de uranilo y enseguida se colocó por 1 minuto en la segunda gota de acetato de uranilo, con la cara de carbono en contacto con cada gota. Al término se acercó una punta de un papel secante para retirar el exceso de solución.

### **5.3 Producción de CaesCCR11 recombinante**

La expresión de la enzima recombinante CaesCCR11 a partir de *E. coli* transformada con el vector *pET3b-caesCCR11* y los sucesivos pasos para su purificación se presentan en el diagrama de flujo de la Figura 5.1.

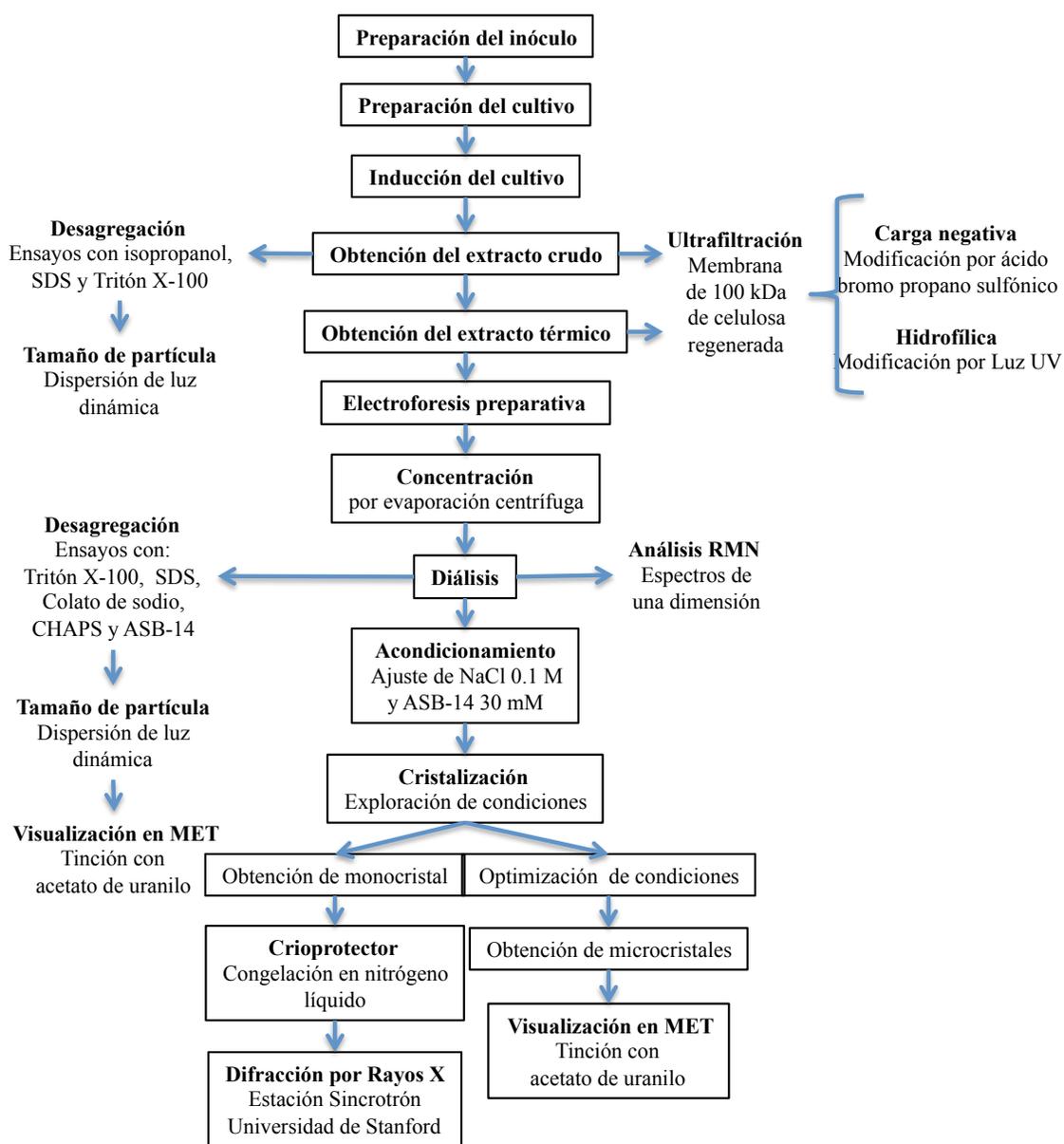


FIGURA 5.1 Diagrama de flujo de las operaciones llevadas a cabo en la purificación de CaesCCR11 recombinante.

### 5.3.1 Preparación del inóculo

El inóculo se preparó a partir de alícuotas de medio cultivado con la cepa transformada con  $DO_{600}=1.0$  conservado en glicerol al 15 % (v/v) en congelación a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ . La cepa transformada (*E. coli* con la construcción *pET3b-caesCCR11*) se reactivó sembrando 0.2 mL de

la cepa conservada en glicerol en un tubo con 2 mL de medio LB (5 g/L NaCl, 5 g/L extracto de levadura y 10 g/L triptona de caseína, pH 6.5) adicionado con ampicilina a una concentración final de 100 µg/mL. El inóculo se incubó por 12 h a 37 °C y 150 rpm en un baño con agitación orbital.

### **5.3.2 Preparación del cultivo e inducción de la expresión de CaesCCR11**

El cultivo se preparó en cinco matraces con 200 mL de medio de cultivo LB con 1 % de inóculo (v/v) y 100 µg/mL de ampicilina, se incubó a 37 °C y 150 rpm en baño con agitación orbital, hasta que  $0.6 < DO_{600} < 1.0$ , una vez alcanzada esta densidad óptica, se agregó IPTG a una concentración final de 0.4 mM para inducir la expresión de CaesCCR11, manteniendo la temperatura a 37 °C por 4 h más a 200 rpm.

### **5.3.3 Obtención del extracto crudo**

El medio cultivado e inducido se centrifugó por 25 min, a 4 °C y 9,000 x g para obtener el paquete celular, mismo que se resuspendió en amortiguador Tris HCl 0.02 M, NaCl 0.1 M, pH 7.5 en una proporción 1:3 (p/v). La lisis celular se realizó mediante pulsos ultrasónicos a 65 % de amplitud en 20 ciclos (pulsos/pausas) de 20 s cada etapa. Enseguida se centrifugó a 4 °C durante 40 min a 20,000 x g. El sobrenadante se separó cuidadosamente y se clarificó mediante micro filtración con membrana de nitrocelulosa (Millipore) de 0.22 µm a un recipiente limpio en baño de hielo, constituyendo el extracto crudo (EC) de CaesCCR11.

### **5.3.4 Obtención del extracto térmico**

El extracto crudo se ajustó a 10 mg/mL de proteína mediante dilución con el mismo amortiguador (Tris HCl 0.02 M, NaCl 0.1 M, pH 7.5), constituyendo así el extracto diluido. En un baño a 60 °C se colocó el extracto diluido dosificado en tubos de ensaye de vidrio procurando que el nivel del agua del baño haya cubierto completamente el volumen que ocupó el extracto diluido dentro del tubo. Se dejaron los tubos en el baño por 3 min para que ocurriera la precipitación térmica. Inmediatamente se enfriaron en baño de hielo y se

centrifugó el extracto crudo precipitado a 4 °C durante 40 min a 20,000 x g. El sobrenadante se separó cuidadosamente y se trasvasó en un recipiente en baño de hielo, constituyendo el extracto térmico (ET) de CaesCCR11.

Los ensayos preliminares realizados en esta etapa, modificando el pH y el tipo de amortiguador, se resumen en la Tabla 5.1.

TABLA 5.1 Ensayos preliminares y condición final de la precipitación térmica.

<b>pH</b>	<b>Amortiguador</b>	<b>Condición</b>	<b>Tiempo</b>
5.0	Acetato de Sodio 0.01 M	Tritón X-100 1% (v/v)	30 min
5.0	Acetato de Sodio 0.01 M	Sin Tritón X-100	30 min
6.5	Fosfato de Potasio 0.01 M	Tritón X-100 2% (v/v)	10 min
6.5	Fosfato de Potasio 0.01 M	Tritón X-100 2% (v/v)	20 min
5.6	Acetato de Sodio 0.01 M	Dilución del EC a 10 mg/ mL de proteína.	10 min
7.5	Tris HCl 0.02 M NaCl 0.1 M	Dilución del EC a 10 mg/ mL de proteína.	3 min

### **5.3.5 Purificación de CaesCCR11 por ultrafiltración**

De inicio se intentó la purificación de CaesCCR11 por medio de la ultrafiltración utilizando membranas de celulosa regenerada. La idea inicial fue hacer una modificación química a la membrana para aumentar su capacidad de separación de acuerdo con la interacción con la proteína de interés o con las proteínas contaminantes. Este es un método del que no se tiene reporte para la purificación de proteínas que se van a cristalizar.

#### **5.3.5.1 Modificaciones químicas a la membrana de ultrafiltración**

Se utilizó una membrana de celulosa regenerada (Millipore) de corte nominal de peso molecular de 100 kDa en cada tratamiento. Para eliminar los residuos del conservador se hizo un lavado a la membrana: se colocó en agua destilada y desionizada durante una hora con

agitación orbital a 70 rpm, con el lado humectado cara abajo, a temperatura ambiente, cambiando el agua tres veces (20 min cada enjuague).

Después del lavado, se realizaron dos tratamientos de modificación química a la membrana. El primero consistió en hacer la membrana más hidrofílica, colocando la membrana lavada en un recipiente con agua destilada, con el lado humectado cara arriba, bajo la luz UV a 254 nm, durante 20 min. Después se dejó en reposo a 4 °C durante 12 h, quedando lista para usarse tras ese periodo (Hernández-Campos *et al.*, 2012).

El segundo tratamiento consistió en conferir a la membrana una carga fuertemente negativa. Primero la membrana se colocó con el lado humectado cara abajo en una solución de NaOH 0.1 N durante 2 h, a temperatura ambiente, con agitación orbital a 70 rpm y después, la membrana se colocó con el lado humectado cara abajo en una solución alcalina de la sal de sodio del ácido 3-bromo propano sulfónico 2 M en NaOH 0.1 N durante 12 h, a 70 rpm, a temperatura ambiente (Rao y Zydney, 2006). Antes de utilizarse con la muestra, la membrana se enjuagó con dos volúmenes de la capacidad de la celda de ultrafiltración con agua destilada y desionizada.

#### **5.3.5.2 Proceso de ultrafiltración**

Se estableció un diseño 2<sup>3</sup> que incluye: dos tipos de membrana de 100 kDa de celulosa regenerada a) modificada por luz UV (hidrofílica) y b) por ácido bromo propano sulfónico (carga negativa); dos valores de pH 5.0 y pH 6.0 (por debajo y por encima del punto isoeléctrico de CaesCCR11) y dos tipos de solución de proteína en extracto crudo y en extracto térmico. Los tratamientos quedaron según la Tabla 5.2.

La solución proteica se ajustó a una concentración de 1 mg/mL de proteína con el amortiguador correspondiente según el pH requerido para cada tratamiento, acetato de sodio

0.01 M pH 5 y fosfato de sodio 0.01 M pH 6. Debe notarse que el amortiguador seleccionado se utilizó desde que se resuspendió el paquete celular para la obtención del extracto crudo.

Se utilizaron celdas de ultrafiltración de 10 y 180 mL (en función del volumen disponible) a una presión de 30 psi. Se reservó 1 ó 0.5 mL de la solución antes de iniciar la ultrafiltración, así como del filtrado y del retenido para cuantificación de actividad y proteína y para la electroforesis en gel de poliacrilamida.

TABLA 5.2 Diseño de experimentos para ultrafiltración con membrana de 100 kDa de celulosa regenerada.

Tratamiento	Modificación a la membrana	pH	Precipitación térmica
A	Ácido bromo propano sulfónico (-)	6	Si, 10 min
B	Luz UV (hidrofílica)	6	Si, 10 min
C	Ácido bromo propano sulfónico (-)	6	No
D	Luz UV (hidrofílica)	6	No
E	Ácido bromo propano sulfónico (-)	5	Si, 30 min
F	Luz UV (hidrofílica)	5	Si, 30 min
G	Ácido bromo propano sulfónico (-)	5	No
H	Luz UV (hidrofílica)	5	No

### 5.3.6 Purificación de CaesCCR11 por electroforesis preparativa

Se utilizó el equipo de electroforesis preparativa Prep Cell Model 491 (Bio Rad) con un gel tubular de poliacrilamida de 10 cm de alto x 37 mm de diámetro. El gel de resolución se preparó al 14.5 % y el de empacamiento al 4%, ambos sin SDS en su formulación. La muestra proveniente del extracto térmico (40 a 50 mg de proteína total) se preparó con: Tris HCl pH 6.8 (0.0625 M), glicerol (10 %, v/v),  $\beta$ -mercaptoetanol (2.5 %), SDS (1 %) en un volumen final de 10 mL, los valores entre paréntesis indican la concentración final.

Se prepararon 4 L de amortiguador de corrida (Tris HCl, Glicina y SDS) y 1 L de amortiguador Tris HCl 0.01 M pH 7.5 para eluir a CaesCCR11. La corrida se hizo a 12 W constantes con enfriamiento de la cámara de electroforesis por medio de un serpentín de cobre con recirculación de anticongelante a 15 °C; el frente salió 8.5 h después de iniciada la corrida, en este momento se inició la colecta de las fracciones (3 mL) y por análisis de las mismas se determinó que 3.5 h después empezó la salida de CaesCCR11. La colecta de CaesCCR11 duró aproximadamente 4 h.

La formulación de los distintos amortiguadores utilizados, del fraguado de los geles de poliacrilamida y el análisis preliminar para elegir las características de altura, grosor y porcentaje de poliacrilamida en el gel tubular se presentan en el Apéndice D.

A las fracciones colectadas por la electroforesis preparativa se les determinó contenido de proteína, actividad enzimática, actividad específica y se visualizaron en un mini gel de poliacrilamida al 14.5 % teñido con azul de Coomasie y al que se le realizó actividad enzimática *in situ* para seleccionar aquellas que se encontraron más puras y con mayor actividad.

Las fracciones seleccionadas se concentraron por medio de evaporación centrífuga, después se dializaron con amortiguador Tris HCl 0.01 M pH 7.5 y se les midió su concentración final de proteína, actividad enzimática y se visualizaron en un mini gel de poliacrilamida.

#### **5.4 Desagregación de CaesCCR11**

Debido a la tendencia de CaesCCR11 a formar agregados proteicos por la naturaleza hidrofóbica de la mayoría de sus residuos aminoácidos, fue necesario explorar las posibles alternativas para desagregarla, tanto en extracto crudo como en estado purificado.

#### **5.4.1 Evaluación de la desagregación en extracto crudo**

Se utilizaron tres agentes en distintas concentraciones: isopropanol al 5, 10, 30, 50 y 70 % (v/v); SDS al 0.1, 0.3, 1 y 2 % (p/v) y Tritón X-100 al 0.4 % (v/v). La proteína se preparó con amortiguador de acetato de sodio 0.05 M pH 5.6 a una concentración final de 2 mg/mL, con el agente correspondiente a un volumen final de 10 mL. Al término de la preparación de las mezclas proteicas se hizo la determinación de actividad enzimática (sección 3.2.1) y la estimación del tamaño mediante dispersión de luz dinámica (sección 3.2.5) de las técnicas analíticas.

#### **5.4.2 Evaluación de la desagregación en CaesCCR11 purificada**

Se utilizaron los detergentes Tritón X-100, SDS, colato de sodio, CHAPS y ASB14, a una concentración de tres veces la concentración micelar crítica. En el caso de ASB14, que es un detergente que no forma micelas, se utilizó a una concentración 30 mM. La concentración de CaesCCR11 fue 0.8 mg/mL en 3 mL de amortiguador Tris HCl 0.02 M pH 7.5, microfiltrado por una unidad de 0.1  $\mu\text{m}$  Millex (Millipore) previo a su mezcla con la proteína y el detergente.

Se prepararon muestras sin proteína para conocer la formación de los agregados propios del detergente y una muestra con proteína sin detergente como control. Todas las muestras se colocaron en tubos de plástico de 5 mL, se agitaron por 2 h a 200 rpm a 25 °C, al término se dejaron las muestras en reposo por una semana, y pasado este tiempo se hicieron las determinaciones de actividad, tamaño de partícula y micrografías electrónicas (secciones 5.2.1, 5.2.5 y 5.2.6 respectivamente).

#### **5.5 Cristalización de CaesCCR11**

La elucidación de la estructura terciaria de una proteína por los métodos de difracción de rayos X o de electrones depende de la calidad del cristal obtenido, tanto en su tamaño como en el orden de su estructura interna. Para llegar al cristal de proteína se requiere que ésta sea

homogénea, pura, soluble y en cantidad suficiente. El primer paso es la exploración de las posibles condiciones de cristalización y después la optimización de aquellas condiciones que resultaron exitosas (hit). (Dr. Enrique Rudiño Piñera, comunicación personal)

### **5.5.1 Primera fase: exploración de condiciones de cristalización**

Se inició con la búsqueda de la condición de cristalización. La proteína purificada en solución a una concentración de 20 y 34 mg/mL, en amortiguador de Tris HCl 20 mM, NaCl 100 mM, pH 7.5 adicionada con ASB14 30 mM se colocó en condiciones de cristalización a 18 °C, por el método de microlote en placas Terasaki (1 µL de solución proteica, 1 µL de solución precipitante y 13 µL de parafina) utilizando las soluciones de diversos kits de cristalización que se presentan en la Tabla 5.3. Las soluciones precipitantes previamente se acondicionaron a la temperatura de incubación con la proteína en las cajas de cristalización.

Se probó la solución precipitante reportada por Rengachari *et al.* (2012), dado que la enzima que ellos cristalizaron tiene una alta homología con la enzima de estudio. La solución precipitante tiene la siguiente formulación: amortiguador MES/imidazol 0.1 M (pH 6.5), polietilén glicol 3350 al 12.5 % (p/v), MPD (2-Metil-2,4-pentanodiol) al 12.5 % (p/v) y una mezcla 0.12 M de monosacáridos (D-glucosa, D-manosa, D-galactosa, L-fructosa, D-xilosa y N-acetil-D-glucosamina).

### **5.5.2 Segunda fase: optimización de la condición de cristalización**

Las características de la condición de cristalización seleccionada, es decir, concentración de proteína, concentración de la solución precipitante, pH, temperatura y aditivos, se acotaron en función de la concentración de proteína y de la concentración de la solución precipitante. Se preparó una matriz de 6 x 4 pozos colocando la condición hit de cristalización en el centro de la matriz y moviendo las concentraciones de proteína y precipitante en la horizontal y en la vertical (Apéndice E).

TABLA 5.3 Kits de cristalización comerciales utilizados en la primera fase de cristalización de CaesCCR11. \*Proteína a 20 mg/mL

Marca	Kit	Número de pozos
Hampton Research	MembFac HR2-114*	25
Hampton Research	MembFac HR2-114	48
Molecular Dimensions	MemSys MD1-25	48
Molecular Dimensions	MemStart MD1-21	48
Jena BioSciences	JBScreen Membrane 1 CS-301L	24
Jena BioSciences	JBScreen Membrane 2 CS-302L	24
Jena BioSciences	JBScreen Membrane 3 CS-303L	24
Jena BioSciences	JBScreen Wizard 1 CS-311	48
Jena BioSciences	JBScreen Wizard 2 CS-312	48
Jena BioSciences	JBScreen Wizard 3 CS-313	48

En la segunda fase de cristalización se utilizó la técnica de gota colgante. Se colocó 1 mL de solución reservorio en el pozo y se conformó la gota colgante con 1  $\mu$ L de la solución proteica y 1  $\mu$ L de la solución precipitante, que se tomó del mismo pozo de la solución reservorio. Cada pozo fue sellado con grasa para alto vacío (Dow Corning) que se colocó en forma de anillo con ayuda de una jeringa sin aguja, sobre el borde de cada pozo, dejando una abertura de 2 mm para permitir la salida del aire. El pozo se selló con la tapa de vidrio delgado plano cuadrado de 22 mm x 1.0 mm (HR3-219, Hampton Research). Las tapas fueron tratadas previamente con silicón.

Se empleó el AquaSil (HR4-611, Hampton Research) al 1 % (v/v) con agua destilada y desionizada para remojar por 30 min las tapas de vidrio, al término se secaron y pulieron con un trapo de microfibra que no deja residuos. Este tratamiento permitió la estabilidad de la gota colgante: es sobre esta tapa que se colocó la gota de cristalización, misma que después se

invirtió sobre el pozo que tiene su respectiva solución reservorio, de esta manera se inició el proceso de transferencia de masa para la formación del cristal de proteína.

En función de los resultados obtenidos en la optimización de las condiciones de cristalización, se probaron distintas alternativas para mejorar la condición de cristalización. Se usó el kit de aditivos HR2-428 (Hampton Research) en la condición en que se obtuvieron agregados proteicos; se modificaron los valores de pH dentro de la matriz cuando los cristales no crecieron y se hizo la resiembra de microcristales usados como semillas en una nueva condición de cristalización, el objetivo fue salir de la zona de nucleación y llevar el cristal semilla a la zona de crecimiento.

La técnica de resiembra de cristales semilla fue la siguiente: se tomó un microcristal con un pelo de caballo y se depositó en una gota nueva que contenía la solución precipitante y la solución proteica. Se incubó en la temperatura que dio origen a los micro cristales.

Se utilizó un robot para colocar soluciones del orden de nL en la técnica de gota apoyada, es de la marca TTPLabtech modelo Mosquito LCP y utilizó cajas de cristalización de 96 pozos. Durante su uso se controló la humedad y la temperatura de la cámara para no alterar las condiciones de la cristalización.

### **5.5.3 Análisis de condiciones de cristalización de CaesCCR11**

Cada condición puesta para cristalizar fue observada *ab initio* con un microscopio óptico a 10x, ahí se detectaron tanto las condiciones exitosas como las no exitosas. Cuando fue observado un cristal unitario o múltiples microcristales el procedimiento para colectarlos y transportarlos fue diferenciado para cada caso, ya que el primero sería difractado por rayos X y los segundos por difracción de electrones.

### **5.5.3.1 Cristal unitario**

Cuando fue observado un cristal unitario inmediatamente se procedió a la elaboración de la solución crioprotectora. Se revisó la formulación de la solución precipitante que dio origen al cristal unitario, de ahí se eligió el aditivo crioprotector que fue agregado a una concentración entre el 30 y el 40 %.

Uno o dos microlitros de la solución crioprotectora, cuya formulación es casi idéntica a la solución precipitante, se colocaron sobre el cristal elegido, se observó que no hubiera daño al cristal y enseguida fue tomado con una asa para ser conservado en nitrógeno líquido y transportado a la estación sincrotrón en la Universidad de Stanford (SSRL).

### **5.5.3.2 Microcristales**

Cuando fue observada una gota con microcristales en el microscopio óptico, se procedió a la tinción con 0.1  $\mu$ L de azul de metileno (Izit HR4-710, Hampton Research) para corroborar que se tratara de cristales de proteína y no inorgánicos. Aquellas gotas seleccionadas, fueron tratadas con el procedimiento indicado en la sección 5.2.6 para ser observadas en el microscopio electrónico de transmisión.

Los microcristales fueron observados en el microscopio electrónico de barrido y de transmisión del Centro Internacional para la Nanotecnología y Materiales Avanzados (ICNAM) de la Universidad de Texas (UTSA).

## **5.6 Análisis molecular del operón *duf-caes* en el genoma de *Geobacillus thermoleovorans* CCR11.**

Cuando se trabajó con la cepa nativa productora de CaesCCR11, *G. thermoleovorans* CCR11, fue para evaluar la expresión de la esterasa en un medio inducido con aceite de oliva y en alta temperatura mediante un choque térmico, así como su expresión a través del ARN mensajero. Se presenta un diagrama de flujo de esta parte experimental en la Figura 5.2.

En el diagrama citado puede verse por un lado, el cultivo de la cepa nativa para extracción de su ADN genómico y proceder a la amplificación de los genes *duf* y *caes* por separado y en operón *duf-caes*. Por otra parte puede verse el cultivo de la cepa en dos modalidades: con y sin inducción de la actividad lipolítica, (medio Schmidt-Dannert y medio Luria-Bertani, respectivamente) ambos cultivos se detienen justo después del choque térmico con el objeto de extraer el RNA mensajero y verificar la expresión de *duf* y *caes* en forma de operón.

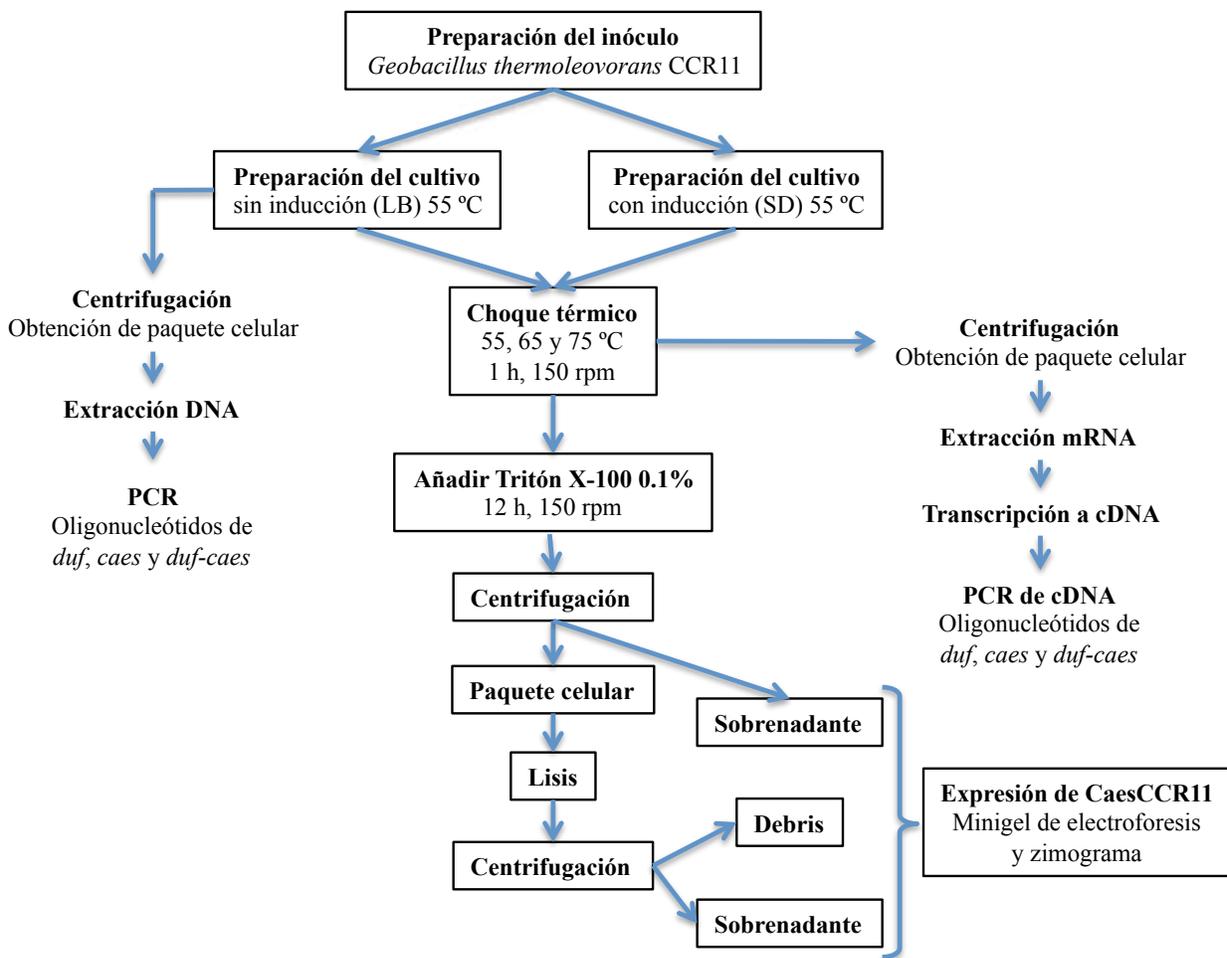


FIGURA 5.2 Diagrama de flujo para la expresión de CaesCCR11 desde la cepa nativa y su expresión desde el ARN en operón con *duf*.

En la parte central del diagrama (Figura 5.2) se aprecia en los recuadros un proceso completo de inducción, expresión y recuperación de la CaesCCR11 nativa en tres fases: la posible proteína excretada en el sobrenadante del medio de cultivo, la proteína intracelular recuperada por lisis celular y la proteína adherida a los restos celulares. En estos tres casos la presencia de CaesCCR11 es corroborada mediante un minigel de electroforesis y zimograma.

### **5.6.1 Producción de CaesCCR11 desde la cepa nativa *G. thermoleovorans* CCR11**

Para reactivar a *G. thermoleovorans* CCR11 se agregaron 0.2 mL de la cepa ultracongelada (-70 °C) y conservada con glicerol a un tubo de ensaye con 2 mL de medio LB, se incubó a 55 °C y 150 rpm en agitación orbital durante 12 horas.

Para inducir la expresión de CaesCCR11 en la cepa nativa se utilizó el medio de cultivo Schmidt-Dannert (aceite de cártamo alto oleico (25.0 mL/L), goma arábica (10.0 g/L), caldo nutritivo (3.25 g/L), CaCl<sub>2</sub> (1 g/L), pH 6.5). La goma arábica, el caldo nutritivo y el CaCl<sub>2</sub> fueron esterilizados en autoclave y emulsificados con el aceite en una licuadora a máxima velocidad por 2 min en condiciones estériles. Una alícuota del 1% (v/v) de un cultivo de 12 h de *G. thermoleovorans* CCR11 en medio LB se usó como inóculo.

Se prepararon tres matraces cuya incubación se realizó a 55 °C, 150 rpm por 16 h, enseguida un matraz se dejó como control a 55 °C y a los otros dos se les realizó el choque térmico a 65 y 75 °C, 150 rpm por 1 h. Ambos matraces se devolvieron a la incubación previa de 55 °C. 15 h después de haber realizado el choque térmico, a los tres matraces se les agregó Tritón X-100 0.1% (v/v) por 12 h a 55 °C, 150 rpm para concluir con el cultivo.

Cada medio de cultivo fue centrifugado a 4 °C, 20 min y 10,000 rpm. La nata oleosa fue cuidadosamente retirada, el sobrenadante intermedio fue separado y el paquete celular fue resuspendido en amortiguador de fosfato de potasio 0.05 M pH 6.5, lisado por pulsos ultrasónicos a 65 % de amplitud en baño de hielo con 20 ciclos de pulsos/pausas de 20 s cada

uno. El paquete celular lisado fue centrifugado a 4 °C, 20 min y 9,000 x g para recuperar el sobrenadante y los restos celulares por separado. Los dos sobrenadantes y los restos celulares se examinaron para verificar la expresión y presencia de CaesCCR11, de acuerdo con la Figura 5.2 referida anteriormente, mediante mini geles de poliacrilamida y zimograma.

### **5.6.2 Extracción de ADN cromosómico**

Para la extracción del ADN cromosómico de *G. thermoleovorans* CCR11 se utilizó el método Tritón-prep, la preparación de las soluciones usadas se presenta en el Apéndice F y el protocolo se describe a continuación: un cultivo de 40 mL en medio LB a 55 °C y 150 rpm de agitación orbital suficientemente crecido ( $0.8 < DO_{600} < 1.0$ ), se centrifugó a 9,000 x g por 7 min a 4 °C para obtener un paquete celular que se resuspendió en 900 µL de amortiguador STET, después se transfirió a un micro tubo y se agregaron 100 µL de solución de lisozima/ribonucleasa, se incubó por 30 min a 37 °C y se paró la reacción calentando durante 50 s a 95 °C, se centrifugó a 16,000 x g por 10 min a 4°C, se transfirió el sobrenadante a otro microtubo y se agregaron 500 µL de solución fría de fenol saturado con amortiguador STET, se mezcló por inversión, se centrifugó a 16,000 x g por 10 min a 4 °C, se transfirió la fase acuosa a otro micro tubo y se agregó 1/10 del volumen de cloruro de litio 4 M, se mezcló por inversión y se dejó reposar 5 min en hielo, se centrifugó a 16,000 x g por 10 min a 4 °C, se transfirió el sobrenadante a otro microtubo y se agregó un volumen igual de isopropanol grado biología molecular, se mezcló por inversión y se dejó reposar 5 min a temperatura ambiente, se centrifugó a 16,000 x g por 10 min a 4 °C, se desechó el isopropanol, se agregaron 100 µL de etanol al 80% frío, se decantó, se dejó reposar secando durante 2 h y se agregaron de 50 a 200 µL de agua libre de nucleasas para solubilizar el ADN extraído.

#### **5.6.2.1 Amplificación de los genes *duf* y *caes* por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

Los oligonucleótidos utilizados fueron sintetizados en la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Los códigos para los

oligonucleótidos iniciadores de *caescr11* son (5421 y 5422, año 2011) y para *duf* (3316 y 3317, año 2016). Las secuencias de dichos oligonucleótidos son:

5421, forward (5'→3'): GGA ATT CCA TAT GAG TGA ACA ATA TCC GGT G

5422, reverse (5'→3'): CGG GAT CCT TAT CCG GCG TGC TTG GCG

3316, forward (5'→3'): GGA ATC CAT ATG ATT TCG TTG CGA TAC TCC A

3317, reverse (5'→3'): CGG GAT CCT TAC CAC ATC GAC AAC CAT G

El programa utilizado para amplificar ambos genes por PCR se presenta en la Tabla 5.4. El ADN templado fue el extraído de *G. thermoleovorans* CCR11 (sección 5.6.2) en la dilución apropiada (inferior a 250 ng totales). Los juegos de oligonucleótidos se utilizaron como sigue: 5421 con 5422 para amplificar a *caescr11*, 3316 con 3317 para amplificar a *duf* y 3316 con 5422 para amplificar ambos genes en operón. En la reacción se utilizó la MasterMix de Promega.

Tabla 5.4 Programa para amplificación de los genes *caescr11* y *duf* por PCR.

Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	95 °C	4 min
	95 °C	40 s
30	57 °C	40 s
	72 °C	40 s
1	72 °C	7 min

Los fragmentos amplificados se observaron mediante la electroforesis en geles de matriz de agarosa al 1%. Dichos geles fueron preparados con agarosa grado electroforesis y amortiguador TAE (Apéndice G), usando bromuro de etidio como indicador fluorescente. Cada muestra de ADN fue diluida con el amortiguador de la muestra 6x y cargada directamente en el pozo correspondiente del gel fraguado de medidas 7.0 x 7.0 cm y 0.75 cm de espesor. El gel se corrió a 90 V por 20 o 25 min según el tamaño de la muestra de ADN.

### **5.6.3 Extracción de ARN mensajero, conversión a ADN complementario y amplificación por PCR**

Se partió de los cultivos referidos en la sección 5.6.1, donde además de la inducción hecha con el medio Schmidt-Dannert se realizó un tratamiento paralelo con medio Luria Bertani como testigo. Fueron en total seis matraces, tres en medio de inducción y tres en medio LB, a cuatro de ellos se les hizo el choque térmico (65 y 75 °C) dejando uno de cada medio como testigo a 55 °C. En todos los casos el experimento fue detenido al término del choque térmico para recuperar el ARN mensajero que estuviera presente y evitar su degradación.

El ARN fue extraído del paquete celular de los distintos cultivos con el reactivo TRIzol (15596026, Thermo Scientific) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Este ARN fue transcrito a ADN complementario por medio del kit (K1622, Thermo Scientific) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ADN complementario fue utilizado como templado para correr la PCR con los oligonucleótidos para *caes* y *duf* como está descrito en el apartado 5.6.2.1 excepto por la sustitución del ADN templado.

### **5.6.4 Análisis bioinformático de las secuencias**

El fragmento amplificado para los dos genes juntos de *G. thermoleovorans* CCR11 desde el ADN cromosómico fue secuenciado en la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Con esta secuencia se hizo una búsqueda en la base de datos de NCBI y se tomó la secuencia del genoma completo de *G. thermoleovorans* KCTC (NZ\_CP014335.1) para completar las zonas corriente arriba y corriente abajo de la secuencia obtenida a partir del fragmento amplificado.

Con el fragmento secuenciado más una parte completada por ambos extremos con el genoma completo de *G. thermoleovorans* KCTC, se buscó la predicción de operones (FGENESB), del promotor (BDGP, BPROM), de regiones transmembrana (DAS TM), de

estructura secundaria (Phyre2), de punto isoeléctrico y peso molecular (ExPASy Compute pI/MW), del grado de hidrofobicidad (ExPASy Prot Scale), del grado del desorden (PrDOS) y de la estructura terciaria (Raptor X).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La producción de CaesCCR11 se llevó a cabo según lo señalado en la sección 5.3, de acuerdo con ello, el extracto crudo suele obtenerse con una concentración alrededor de 20 mg/mL y una actividad de alrededor de 16,000 U/mL.

### 6.1 Determinación del punto isoeléctrico de proteínas en el extracto crudo.

Se hizo la determinación del punto isoeléctrico de la proteína de interés y de las proteínas contaminantes, a partir del extracto crudo. Esto con el objeto de considerar el valor del pH del amortiguador como elemento para la purificación, en función de la carga que la proteína de interés o las contaminantes adquieran y de la carga que posea la membrana.

Se obtuvo el extracto crudo según se indicó en la sección 5.3.3 y se realizó el experimento descrito en la sección 5.2.4. Al término de la corrida del Rotofor se colectaron 20 fracciones a las que se les midió el pH con tiras reactivas y se cargaron en un gel de poliacrilamida (Figura 6.1) a dichas fracciones no se les hizo el ensayo de actividad.

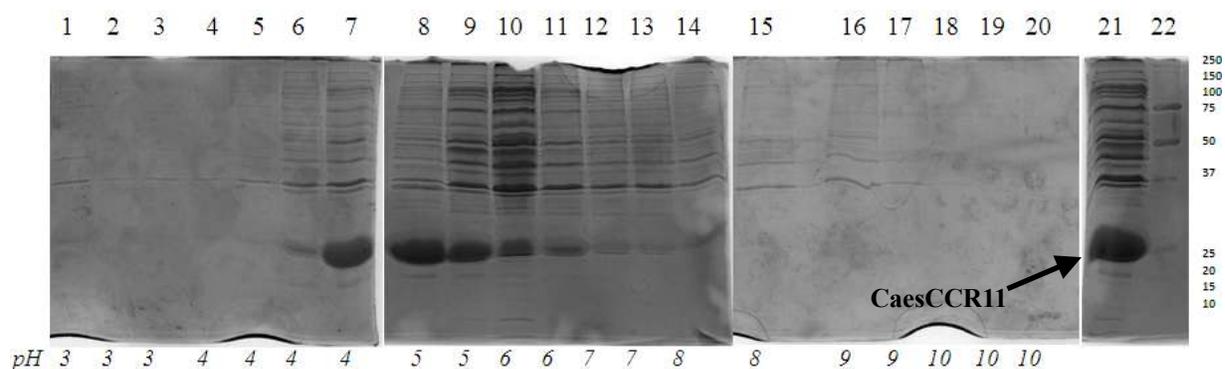


FIGURA 6.1 Electroforesis de gel de poliacrilamida al 12% en condiciones disociantes. Carriles: (1 a 20) fracciones del Rotofor; (21) extracto crudo y (22) marcador de peso molecular 161-0377 de BioRad; abajo en cursivas se indica el valor de pH de cada fracción.

El punto isoeléctrico de CaesCCR11 se considera cercano a 5.0 (Figura 6.1), mientras que para la mayoría de las proteínas contaminantes se estima entre 5.0 y 6.0; por otra parte, el cálculo del punto isoeléctrico *in silico*, con la secuencia de aminoácidos de CaesCCR11, es de 5.31 (servidor ExPASy de Gasteiger *et al.*, 2005).

Se realizó una búsqueda en la base de datos de las proteínas de *Escherichia coli* (EcoProDB; <http://eecoli.kaist.ac.kr> Yun *et al.*, 2007) y se encontró que están reportadas al menos 258 proteínas con punto isoeléctrico entre 4.45 y 6.36, de las cuales seis tienen peso molecular entre 26,500 y 28,594 Da y punto isoeléctrico entre 4.9 y 5.86. Este resultado coincide con la separación que hizo el Rotofor (Figura 6.1) y muestra la complejidad del sistema a partir del cual se desea purificar a la enzima de interés.

## **6.2 Obtención del extracto térmico de CaesCCR11.**

La precipitación térmica es un proceso inicial de purificación no selectiva, utilizado con frecuencia para las enzimas de organismos termófilos e hipertermófilos, debido a su capacidad de resistir la desnaturalización por el aumento de la temperatura (Atomi e Imanaka, 2004). Esta condición cobra relevancia cuando se trata de enzimas termófilas recombinantes expresadas en hospederos mesófilos como *E. coli*.

La precipitación térmica se llevó a cabo según la Tabla 5.1. El extracto crudo se diluyó 1:1 (v/v) aproximadamente a 10 mg/mL de proteína, en amortiguador de acetato de sodio 0.01 M a pH 5.0; se hicieron dos tratamientos con y sin Tritón X-100 al 1% (v/v) y se hizo la precipitación térmica a 60 °C por 30 min, después se centrifugó a 25 °C por 15 min a 20,000 x g. El resultado se muestra en la Figura 6.2 y Tabla 6.1.

Se observa un patrón de bandas diferenciado (Figura 6.2) entre el sobrenadante (carriles 2 y 5) y el precipitado (carriles 3 y 6), donde la proteína de interés se queda prácticamente en el sobrenadante. Sin embargo, de acuerdo con los datos de purificación

obtenidos (Tabla 6.1), a las condiciones de 60 °C por 30 min se separa la proteína de interés en la fracción soluble pero perdió actividad.

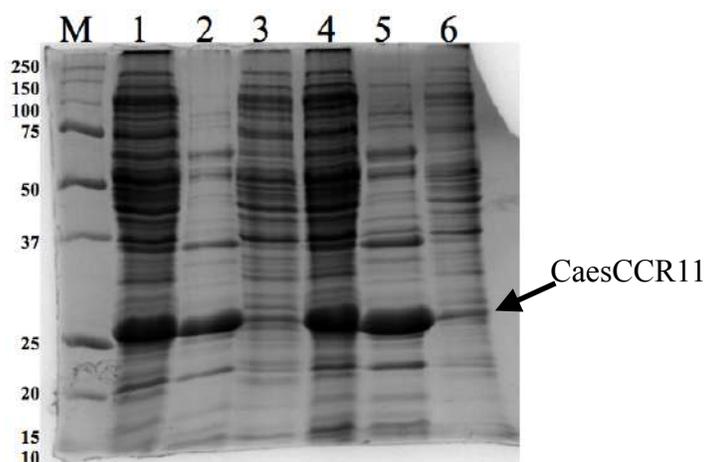


FIGURA 6.2 Electroforesis de gel de poliacrilamida al 12% en condiciones disociantes de las muestras obtenidas de la precipitación térmica con y sin Tritón X-100. Carriles: (M) marcador de peso molecular 161-0377 de BioRad; (1) Extracto crudo con Tritón X-100 al 1% (v/v), (2) Sobrenadante de extracto crudo con Tritón X-100, (3) Precipitado de extracto crudo con Tritón X-100, (4) Extracto crudo sin Tritón X-100, (5) Sobrenadante de extracto crudo sin Tritón X-100 y (6) Precipitado de extracto crudo sin Tritón X-100.

TABLA 6.1 Datos de purificación y recuperación de CaesCCR11 después de la precipitación térmica a 60 °C por 30 min. (\*con Tritón X-100 al 1% (v/v)) correspondiente a la Figura 6.2. EC, extracto crudo; S, sobrenadante y P, precipitado.

Carril	Paso	Vol (mL)	Act. Total (U)	Prot. Total (mg)	Act. Esp. (U/mg)	Purificación	Recuperación
1	EC*	8	38,313	140.52	272.65	1.00	100
2	S*	5.6	14,962	33.66	444.44	1.63	39
3	P*	0.3	72	2.00	36.13	0.13	0
4	EC	8	25,043	155.33	161.23	1.00	100
5	S	5.6	7,877	31.63	249.01	1.54	31
6	P	0.3	47	0.45	104.54	0.65	0

La principal diferencia entre los tratamientos, atribuida al Tritón X-100, consiste en la capacidad que tiene para reducir la viscosidad de la mezcla después de la precipitación térmica. De acuerdo con los datos de la Tabla 6.1, su presencia no ayuda a que CaesCCR11 conserve su actividad lipolítica.

Derivado de estos resultados, se hizo otro experimento reduciendo el tiempo de precipitación por temperatura a 20 y 10 min, se aumentó la cantidad de Tritón X-100 a 2 % (v/v), se utilizó un amortiguador más alejado del punto isoeléctrico (fosfato de potasio 0.01 M pH 6.5) y se modificó la centrifugación a 4 °C por 15 min a 20,000 x g. Estos resultados se presentan en la Figura 6.3 y en la Tabla 6.2.

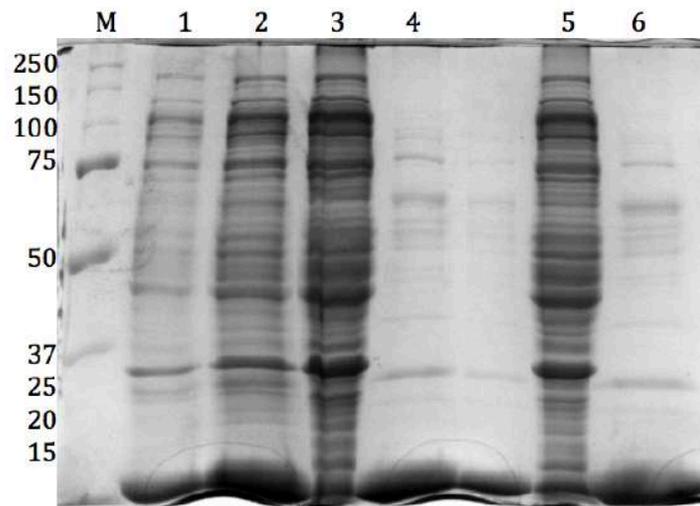


FIGURA 6.3 Electroforesis de gel de poliacrilamida al 12% en condiciones disociantes de las muestras obtenidas de la precipitación térmica con Tritón X-100 al 2% (v/v). Carriles: (M) marcador de peso molecular 161-0377 de BioRad; (1) Extracto crudo sin Tritón X-100, (2) Extracto crudo con Tritón X-100 al 2% (v/v), (3) Precipitado de 10 min de extracto crudo, (4) Sobrenadante de 10 min de extracto crudo, (5) Precipitado de 20 min de extracto crudo y (6) Sobrenadante de 20 min de extracto crudo.

El objetivo de incorporar el Tritón X-100 a la mezcla fue porque la precipitación térmica a 60 °C por 30 min producía una mezcla semi-sólida que era difícil hacer que fluyera. Este resultado se explica según Shiraki *et al.* (2002), donde reportan la formación de

agregados proteicos durante el incremento de la temperatura. En este caso las proteínas contaminantes del hospedero mesófilo *E. coli*. El Tritón X-100 pareciera que entra en contacto con las partes hidrofóbicas de todas las proteína presentes evitando la compactación o permitiendo el deslizamiento entre las moléculas de proteínas.

TABLA 6.2 Datos de purificación y recuperación de CaesCCR11 después de la precipitación térmica a 60 °C por 10 y 20 min. (\*con Tritón X-100 al 2% (v/v)) correspondiente a la Figura 6.3. EC, extracto crudo; S, sobrenadante y P, precipitado.

Carril	Paso	Vol (mL)	Act. Total (U)	Prot. Total (mg)	Act. Esp. (U/mg)	Purificación	Recuperación
2	EC*	10	139,855	97.88	1,428.91	1	100
3	S*10	7	118,696	43.44	2,732.15	1.91	85
4	P*10	0.2	138	0.57	241.86	0.17	0
5	S*20	7	50,217	32.66	1,537.56	1.08	36
6	P*20	0.2	122	0.67	181.64	0.13	0

El tratamiento de 10 minutos a 60 °C, en el sobrenadante (Tabla 6.2) muestra un mayor grado de pureza y recuperación de CaesCCR11 respecto a los resultados de la Tabla 6.1.

El uso de detergentes en la etapa de purificación por precipitación térmica fue reportado por Byun y colaboradores (2007) para la carboxilesterasa EstE1 (PDB: 2BZQ), que tiene un *pI* teórico de 5.82. Ellos prepararon una solución proteica con amortiguador de fosfato de sodio 50 mM, NaCl 300 mM, pH 8, adicionada con imidazol 10 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 10 mM, glicerol al 10 % (v/v) y Nonidet P-40 al 1 % (v/v) que es un detergente similar al Tritón X-100. La precipitación térmica fue conducida por 10 min a 80 °C y la recuperación del sobrenadante por centrifugación se realizó por 30 min a 4 °C y 20,000 x g.

Otros reportes del uso de la precipitación térmica en la purificación de carboxilesterasas son: De Simone y colaboradores (2001) donde la AFEST (*pI* 5.06, PDB:

1JJI) en solución de amortiguador Tris HCl 25 mM pH 8, MgCl<sub>2</sub> 2.5 mM, EDTA 0.5 mM y DTT 1 mM se sometió a 90 °C durante 10 min para precipitación de proteínas que fueron separadas por centrifugación a 4 °C por 30 min a 17,000 x g. Liu *et al.* (2004) precipitaron por temperatura las proteínas en solución con Est30 (pI 5.03, PDB: 1TQH) durante 20 min a 60 °C en amortiguador Tris HCl 10 mM pH 8 y recuperaron el sobrenadante por centrifugación durante 20 min a 4°C y 12,000 x g. Palm *et al.*, (2011) utilizaron la precipitación térmica en las etapas iniciales de purificación para PestE (pI 6.40, PDB: 2WIR) en amortiguador Tris HCl 20 mM pH 8, calentando a 80 °C por 20 min y centrifugando por 20 min a 4°C y 16,000 x g.

Debe notarse que en todos los casos señalados se utilizó el amortiguador a pH 8, valor más alto que el punto isoeléctrico teórico calculado para las distintas proteínas reportadas. Este hecho determina que las proteínas posean una carga antes y durante el calentamiento, así, además de las interacciones hidrofóbicas también intervienen las interacciones iónicas, y la proteína se hace más susceptible a la agregación. De ahí que el tiempo para la precipitación disminuya con el incremento del pH, según las Tablas 6.1, 6.2 y 6.3.

En el caso de CaesCCR11, su alta homología con la mono acil glicerol lipasa b-MAGL reportada por Rengachari y colaboradores (2012) permite probar el efecto del amortiguador utilizado por ellos en la precipitación térmica para CaesCCR11. De acuerdo con esto, el extracto crudo fue diluido 1:1 (aproximadamente a 10 mg/mL de proteína) con amortiguador Tris HCl 0.02 M a pH 7.5 adicionado con NaCl 0.01 M. Se incubó la mezcla en baño a 60 °C y después de 3 minutos sobrevino la precipitación de proteínas. Se centrifugó inmediatamente a 4 °C por 40 min a 20,000 x g y se recuperó el sobrenadante como extracto térmico.

Para efectos de comparación se hizo un experimento simultáneo usando amortiguador de acetato de sodio 0.01 M a pH 5.6, la precipitación sobrevino a los 10 min de incubación a 60 °C. Se centrifugó bajo las mismas condiciones y el sobrenadante se recuperó como extracto térmico. Los resultados de este experimento se presentan en la Figura 6.4 y en la Tabla 6.3.

Los resultados de la Figura 6.4 muestran nuevamente un patrón de bandas diferenciado entre el sobrenadante (carriles 2 y 5) y el precipitado (carriles 3 y 6), CaesCCR11 se queda prácticamente en el sobrenadante (constituyendo el extracto térmico). Sin embargo, el efecto del pH del amortiguador utilizado resultó en un tiempo menor de incubación para alcanzar la precipitación de proteínas por temperatura. A pH 7.5 el tiempo para precipitar fue de 3 min comparado con los 10 min cuando se usó el amortiguador a pH 5.0 y 5.6.

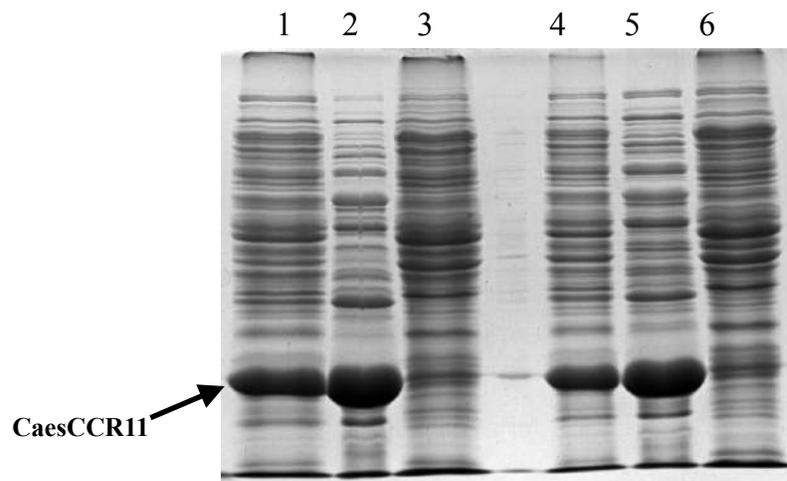


FIGURA 6.4 Electroforesis de gel de poliacrilamida al 12% en condiciones disociantes de las muestras obtenidas de la precipitación térmica a pH 5.6 y pH 7.5. Carriles: (1) Extracto crudo obtenido a pH 5.6, (2) Sobrenadante por centrifugación después de la precipitación térmica a pH 5.6, (3) Sedimento por centrifugación después de la precipitación térmica a pH 5.6, (4) Extracto crudo obtenido a pH 7.5, (5) Sobrenadante por centrifugación después de la precipitación térmica a pH 7.5 y (6) Sedimento por centrifugación después de la precipitación térmica a pH 7.5.

El amortiguador a pH de 7.5 confiere a la mayoría de las proteínas presentes en el extracto crudo una carga negativa, a diferencia de los amortiguadores usados a pH de 5.0 y 5.6, donde la mayoría de las proteínas están muy cerca de su punto isoeléctrico. El hecho de que las proteínas posean una carga favorece la repulsión o atracción entre ellas, contrario al punto isoeléctrico, donde las proteínas suelen formar una macromolécula y ser más estables.

TABLA 6.3 Datos de purificación y recuperación de CaesCCR11 después de la precipitación térmica a 60 °C por 10 min a pH 5.6 y por 3 min a pH 7.5. correspondiente a la Figura 6.4. EC, extracto crudo; S, sobrenadante y P, precipitado; los subíndices indican el valor de pH.

Carril	Paso	Vol (mL)	Act. Total (U)	Prot. Total (mg)	Act. Esp. (U/mg)	Purificación	Recuperación
1	EC <sub>5.6</sub>	25	660,870	276	2,391	1.00	100.00
2	S <sub>5.6</sub>	46	330,238	117	2,824	1.18	49.97
3	P <sub>5.6</sub>	12	6,402	108	59	0.02	0.97
4	EC <sub>7.5</sub>	26	70,5014	235	2,995	1.00	100.00
5	S <sub>7.5</sub>	48	448,944	145	3,092	1.03	63.68
6	P <sub>7.5</sub>	12	15,576	108	145	0.05	2.21

De los datos de purificación (Tabla 6.3) puede decirse que ambos procesos son comparables aún con la diferencia del amortiguador utilizado por la compensación en el tiempo de precipitación. La estabilidad de las proteínas contaminantes y de CaesCCR11 conferida por el amortiguador cercano al punto isoeléctrico (pH 5.6) y la inestabilidad a pH 7.5, se vio compensada por el tiempo de incubación a 60 °C. El tratamiento seleccionado fue el de pH 7.5 a 60 °C por 3 min tomando el sobrenadante como el extracto térmico (ET).

### 6.3 Purificación de CaesCCR11 por ultrafiltración.

Estos experimentos se realizaron de acuerdo con el diseño presentado en la Tabla 5.2. En la realización de los tratamientos para la ultrafiltración, se utilizó el amortiguador a pH 5.0 (acetato de sodio, 0.01 M) ó 6.0 (fosfato de potasio, 0.01 M) desde la resuspensión del paquete celular. Con el mismo amortiguador, sin ajustar el pH a 60 °C, se realizó la precipitación térmica, cuando fue indicado según el tratamiento. Antes de hacer la precipitación térmica la proteína fue ajustada a 10 mg/mL y antes de hacer la ultrafiltración la proteína fue ajustada entre 1 y 3 mg/mL.

En la Figura 6.5 se muestra el gel de poliacrilamida de las etapas recuperadas (extracto diluido, filtrado y retenido) de cada tratamiento. Se aprecia una diferencia en el patrón de

bandas entre el extracto crudo y el extracto térmico, mas no así entre las fracciones de extracto diluido, el filtrado y el retenido de algunos tratamientos.

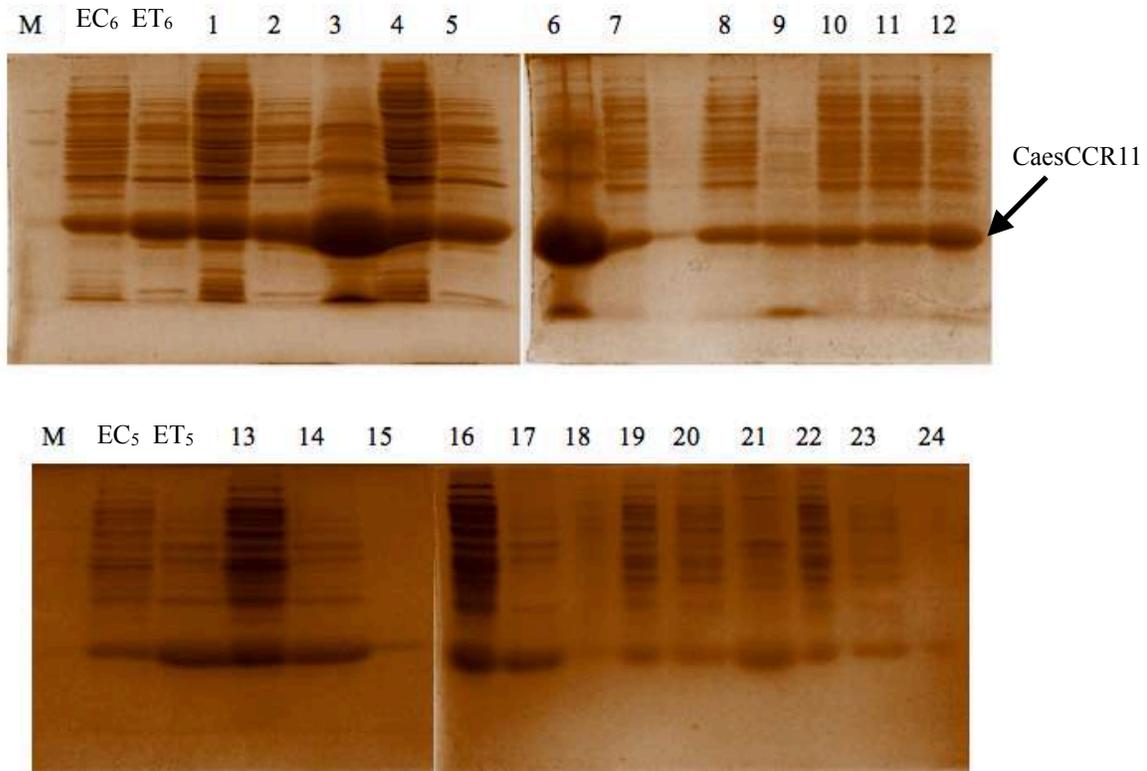


FIGURA 6.5 Electroforesis de gel de poliacrilamida al 12% en condiciones disociantes de los distintos procesos de ultrafiltración. Carriles: (M) marcador de peso molecular; (EC) extracto crudo; (ET) extracto térmico, los subíndices es el pH del amortiguador; (1 a 3) diluido, retenido y filtrado del tratamiento A; (4 a 6) diluido, retenido y filtrado del tratamiento B; (7 a 9) diluido, retenido y filtrado del tratamiento C; (10 a 12) diluido, retenido y filtrado del tratamiento D; (13 a 15) diluido, retenido y filtrado del tratamiento E; (16 a 18) diluido, retenido y filtrado del tratamiento F; (19 a 21) diluido, retenido y filtrado del tratamiento G y (22 a 24) diluido, retenido y filtrado del tratamiento H.

Por otra parte, del resultado de la purificación (Tabla 6.4) puede decirse que la enzima de interés se queda en el retenido cuando la membrana es hidrofílica (luz UV), tal y como se había estimado; sin embargo, con la membrana con carga negativa (ácido bromo propano sulfónico) la enzima se queda en el retenido en los dos valores de pH (5 y 6) cuando ésta

debería tener un comportamiento diferenciado al adquirir cargas diferentes en esos valores de pH: positiva a pH 5 y negativa a pH 6.

TABLA 6.4. Datos de purificación de los distintos tratamientos propuestos para la purificación por ultrafiltración.

Trat.	Paso	Vol (mL)	Act. Total (U)	Prot. Total (mg)	Act. Esp (U/mg)	Purificación	Recuperación (%)
	EC pH 6	20.00	347,971	438	795	1.00	100.00
	EC dil pH 6	41.50	485,971	308	1,576		
	ET pH 6	40.00	273,768	143	1,918	2.41	78.68
A	Diluido	11.00	75,286	39	1,918		
	Retenido	1.10	91,587	46	2,011	1.05	33.45
	Filtrado	10.00	6,046	10	616	0.32	2.21
B	Diluido	11.00	75,286	39	1,918		
	Retenido	1.20	173,565	48	3,641	1.90	63.40
	Filtrado	9.70	3,270	7	497	0.26	1.19
	EC pH 6	1.44	25,054	32	795	1.00	100.00
C	Diluido	10.50	28,457	28	1,007		
	Retenido	1.50	109,130	33	3,351	4.21	435.58
	Filtrado	9.40	441	4	124	0.16	0.02
D	Diluido	10.50	88,299	23	3,855		
	Retenido	1.14	19,876	25	803	1.01	79.33
	Filtrado	9.00	874	4	202	0.25	3.49
	EC pH 5	28.35	477,225	644	741	1.00	100.00
	EC dil pH 5	62.00	522,507	581	899		
	ET pH 5	59.50	309,788	169	1,831	2.47	64.91
E	Diluido	11.00	57,272	31	1,831		
	Retenido	1.30	106,261	36	2,942	1.61	34.30
	Filtrado	9.80	1,812	6	313	0.17	0.59
F	Diluido	11.00	57,272	31	1,831		
	Retenido	1.25	125,634	34	3,659	2.00	40.55
	Filtrado	9.50	3,106	9	361	0.20	1.00
	EC pH 5	1.38	23,230	31	741	1.00	100.00
G	Diluido	10.50	18,961	25	744		
	Retenido	1.20	96,000	31	3,058	4.13	413.26
	Filtrado	9.70	381	3	119	0.16	1.64
H	Diluido	10.50	82,022	12	7,027		
	Retenido	1.25	17,283	50	347	0.47	74.40
	Filtrado	9.00	730	0	6,433	8.69	3.14

Los filtrados de los tratamientos C, E y H (Figura 6.5; carriles 9, 15 y 24 respectivamente), por inspección del cambio de patrón de bandas en el gel, podría pensarse que la proteína se purifica un poco, incluso el valor de purificación del filtrado del tratamiento H es alto (Tabla 6.4), sin embargo, estos resultados no fueron repetibles.

Debe añadirse que la modificación a las membranas por sí misma tuvo un efecto en la interacción de ésta con las proteínas. Cuando al término de la ultrafiltración fue recortado un trozo de la membrana para realizar con ella el ensayo de actividad, éste dio positivo por arriba del límite de detección válido para el ensayo, lo que implica que la enzima tuvo alguna forma de adsorción en la membrana.

La determinación de actividad lipolítica se repitió 24 horas después, con otro trozo de la misma membrana que se dejó remojando a temperatura ambiente en agua destilada y desionizada. Esta vez el resultado dio negativo, pero el agua de remojo dio positivo en un valor por arriba del límite de detección válido para el ensayo. Este resultado indica que la enzima de interés se desprendió de la membrana usada en la ultrafiltración.

De no haber sido por las modificaciones químicas realizadas a la membrana, las proteínas se habrían quedado adheridas, ya sea por interacciones hidrofóbicas o electrostáticas en la matriz de la membrana, aún a pesar del enjuague de 24 horas.

Para verificar la pureza de las proteínas desprendidas de la membrana, se realizó la electroforesis de un gel de poliacrilamida en condiciones disociantes para el agua de enjuague de la membrana (Figura 6.6). Puede apreciarse que no sólo CaesCCR11 participó de la interacción con la membrana, sino que fueron otras proteínas también las que interactuaron con ella o quizá con CaesCCR11 misma. Este experimento, junto con la determinación del punto isoeléctrico (Figura 6.1), pone en evidencia la complejidad del sistema proteico del que pretende purificarse la enzima de estudio. Puede ser que CaesCCR11 interactúa no solo con

ella misma, sino con otras proteínas de *E. coli*, tanto por una posible similitud con sus contenidos de residuos hidrofóbicos como por la cercanía de sus puntos isoeléctricos.

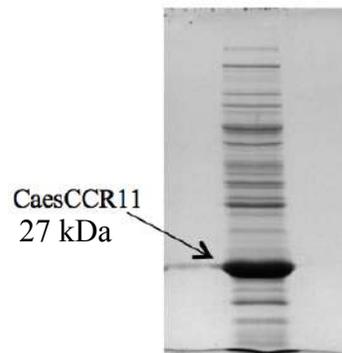


FIGURA 6.6 Electroforesis de gel de poliacrilamida al 12% en condiciones disociantes del agua de enjuague de la membrana de celulosa regenerada utilizada en ultrafiltración.

Por otra parte, se realizó la cuantificación relativa de bandas en el gel de poliacrilamida de la Figura 6.5. con el software ImageLab (Bio Rad). Se utilizó como referencia la banda correspondiente a CaesCCR11, respecto del resto de las bandas en el carril.

Los resultados (Tabla 6.5) indican que en los tratamientos A, B, C, D y F tanto CaesCCR11 como las proteínas contaminantes se distribuyeron en el retenido y en el filtrado. En el tratamiento G, la enzima de interés pasó un poco más en el filtrado.

Por otro lado, en los tratamientos E y H la enzima de interés pasó definitivamente pura aunque fue muy poca. De hecho, el filtrado del tratamiento H podría indicar un proceso de purificación que coincide con el valor de purificación obtenido en la Tabla 6.4, sin embargo este tratamiento no fue repetible. Es posible que la causa sea la formación de agregados proteicos, tanto entre CaesCCR11 como con otras proteínas contaminantes.

En el análisis *in silico* de la secuencia de aminoácidos de CaesCCR11 se encontró un contenido ligeramente superior al 50 % de residuos hidrofóbicos (Espinosa-Luna *et al.*, 2016).

Este contenido favorece la agregación de la proteína por interacciones hidrofóbicas, entre moléculas de la misma enzima así como con otras proteínas, produciendo agregados de diversa composición y tamaño.

TABLA 6.5 Cuantificación relativa de las bandas de proteínas de los distintos tratamientos propuestos según la Figura 6.5. El porcentaje es referido a la banda correspondiente a CaesCCR11 respecto del total de las bandas presentes en el carril (software ImageLab del fotodocumentador GelDoc, BioRad).

Tratamiento	Carril	Paso	CaesCCR11 (%)
	EC <sub>6</sub>	EC pH 6	22.90
	ET <sub>6</sub>	ET pH 6	59.80
A	1	Diluido	22.50
	2	Retenido	60.00
	3	Filtrado	67.40
B	4	Diluido	25.50
	5	Retenido	56.00
	6	Filtrado	68.10
C	7	Diluido	61.30
	8	Retenido	56.60
	9	Filtrado	70.70
D	10	Diluido	55.30
	11	Retenido	56.00
	12	Filtrado	68.40
	EC <sub>5</sub>	EC pH 5	45.60
	ET <sub>5</sub>	ET pH 5	74.50
E	13	Diluido	42.50
	14	Retenido	72.20
	15	Filtrado	100.00
F	16	Diluido	39.70
	17	Retenido	68.10
	18	Filtrado	40.50
G	19	Diluido	29.30
	20	Retenido	35.00
	21	Filtrado	57.00
H	22	Diluido	28.00
	23	Retenido	43.80
	24	Filtrado	100.00

Rúa *et al.* (1997) reportaron agregación heterogénea en una lipasa de *Bacillus thermocatenulatus*, cuyo contenido de residuos hidrofóbicos era apenas superior al 33%. Más tarde, Schlieben *et al.* (2004) expresaron y purificaron la lipasa BTL2 de *B. thermocatenulauts* (presumiblemente la misma cepa de Rúa *et al.* 1997, pero distinta enzima), y ésta formó agregados durante la concentración de la solución proteica mediante ultrafiltración con membrana de corte nominal de 30 kDa, aún en presencia del detergente LDAO. En el caso de CaesCCR11, cuando no se usó Tritón X-100 en la mezcla proteica, una capa delgada adherida a la membrana quedaba al final en los experimentos de ultrafiltración. Sin embargo, no se corroboró la ausencia de agregados por medio de cromatografía de exclusión molecular.

La formación de agregados no sólo afecta al proceso de purificación por membranas de ultrafiltración. La lipasa extracelular de *B. subtilis* 168 fue estudiada en forma nativa por Lessuisse y colaboradores (1993). Encontraron que mostró una fuerte tendencia a formar agregados, por ello la proteína nunca eluyó como un solo pico de la columna cromatográfica y también reportan que la actividad específica de la enzima purificada fue variable de una preparación a otra. Señalaron que los problemas relacionados con la agregación son responsables del bajo rendimiento en la purificación y que no desearon usar detergentes en lo posible porque tenían en curso la cristalización de la enzima. Reportaron que debido a la agregación perdieron mucha proteína como material insoluble, sin embargo lograron reunir más de 100 mg de proteína con alto grado de pureza. Años más tarde, Pouderoyen *et al.* (2001) y Kawasaki *et al.* (2002) reportaron la cristalización y elucidación de la estructura de la lipasa extracelular de *B. subtilis* 168 tras un complejo método de purificación con columnas cromatográficas.

#### **6.4 Purificación de CaesCCR11 por electroforesis preparativa**

La electroforesis preparativa se eligió como alternativa a la purificación por ultrafiltración por dos razones: CaesCCR11 migraba en su estado monomérico justo en su peso molecular cuando era sometida a electroforesis de geles de poliacrilamida en condiciones

disociantes y se mantenía con actividad lipolítica según los análisis *in situ* (zimogramas). Por otra parte, el vector de clonación utilizado no posee firma de purificación en CaesCCR11, por lo que una purificación por cromatografía de afinidad no fue posible.

El punto más importante para resolver en la electroforesis preparativa fue la cantidad de SDS en el amortiguador de carga de la muestra, dado que una concentración superior al 0.1 % (p/v) podría comprometer la actividad enzimática de CaesCCR11. A este respecto, la formulación original según la operación del Prep Cell (BioRad), indicó que el SDS debía agregarse al 2 % (p/v), el experimento fue realizado con una concentración de 1 % (p/v) de acuerdo a la formulación presentada en el apartado 5.3.6. Este fue todo el SDS en contacto con la muestra, ni los geles tubulares de poliacrilamida ni los amortiguadores de corrida o de elución se prepararon con SDS.

Las fracciones recuperadas se analizaron en su contenido de proteína, actividad enzimática y se corrieron por electroforesis en minigeles de poliacrilamida; los resultados se muestran en las Figuras 6.7, 6.8 y en la Tabla 6.6.

Las fracciones 126 a 161 son las que poseen mayor actividad enzimática (Figura 6.7, Panel A); considerando además el grado de pureza de las bandas en la Figura 6.8, es que se seleccionaron aquellas para concentrar por evaporación centrífuga.

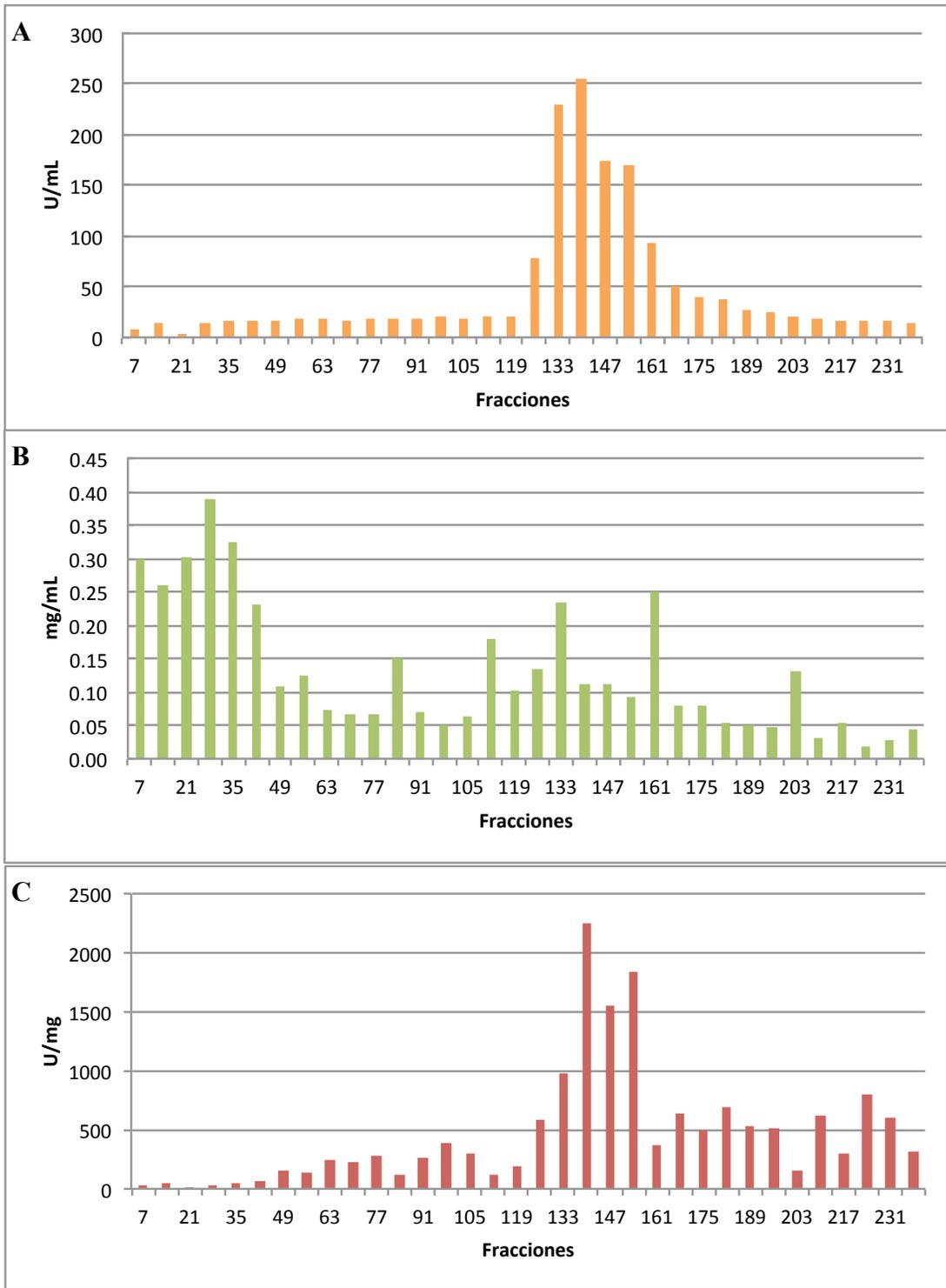


FIGURA 6.7 Análisis de fracciones colectadas de la electroforesis preparativa. (A) Determinación de actividad lipolítica, (B) Determinación de proteína y (C) Actividad específica de cada fracción. En el eje horizontal están los números consecutivos de las fracciones colectadas.

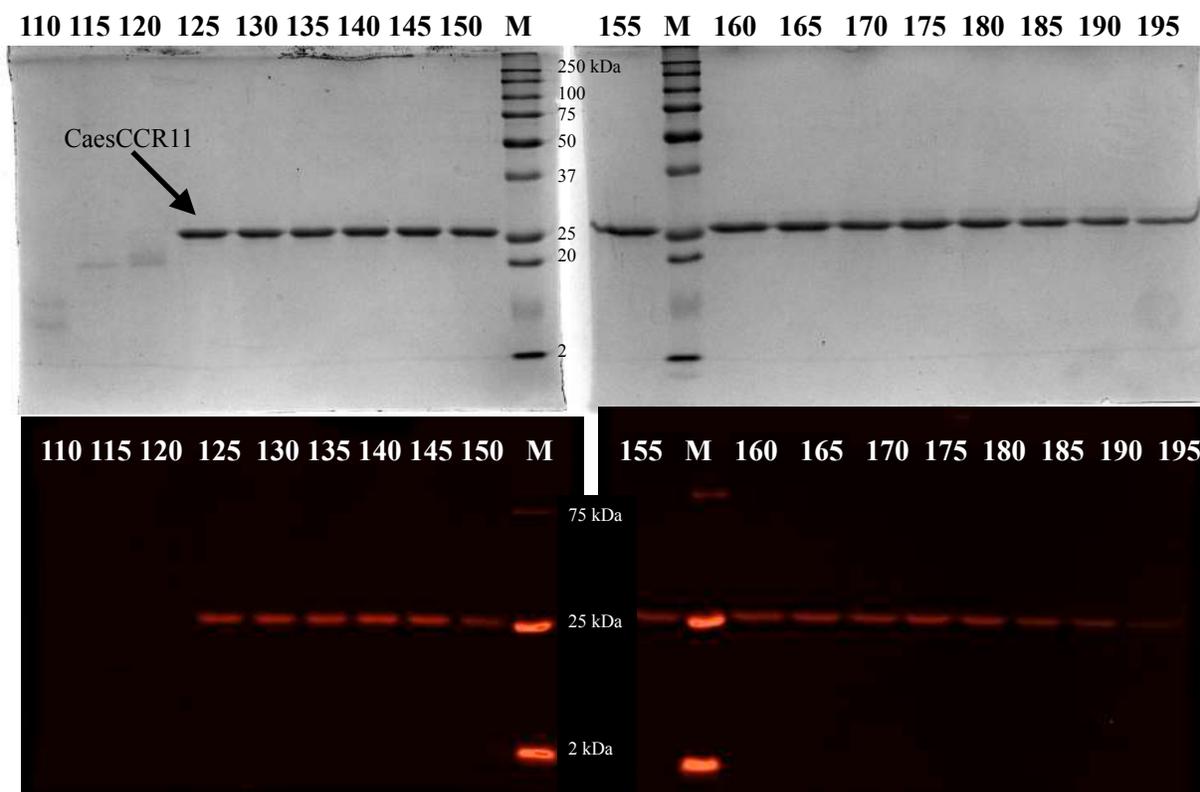


FIGURA 6.8 Electroforesis de geles de poliacrilamida al 14.5 % en condiciones disociantes de algunas fracciones seleccionadas en la colecta a la salida de la electroforesis preparativa. En la parte superior están los geles teñidos con azul de Coomassie y en la parte inferior está el zimograma de los mismos geles. Los carriles con número son las fracciones correspondientes, (M) marcador de peso molecular 161-0377 de BioRad.

TABLA 6.6 Datos de purificación y recuperación global de CaesCCR11 después del proceso de purificación desarrollado. EC: extracto crudo, EC dil: extracto crudo diluido, ET: extracto térmico, EE: extracto electroforético y Eenz: extracto enzimático.

Paso	Vol (mL)	Act. Total (U)	Prot. Total (mg)	Act. Esp. (U/mg)	Purificación	Recuperación
EC	3.42	46,896	52	897	1.00	100.00
EC dil	6.83	62,363	53	1,166	1.30	132.98
ET	6	77,826	33	2,326	2.59	165.95
EE	72	12,013	12	1,043	1.16	25.62
Eenz	1	2,424	13	186	0.21	5.17

En la Figura 6.9 se puede ver el grado de purificación de CaesCCR11 en las distintas etapas, en el extracto crudo, en el extracto térmico y en el extracto enzimático final. Debe hacerse notar la alta expresión de la enzima en el sistema de clonación utilizado y cómo esta alta expresión contribuye al grado de pureza obtenido en función de las fracciones seleccionadas para su concentración por evaporación centrífuga.

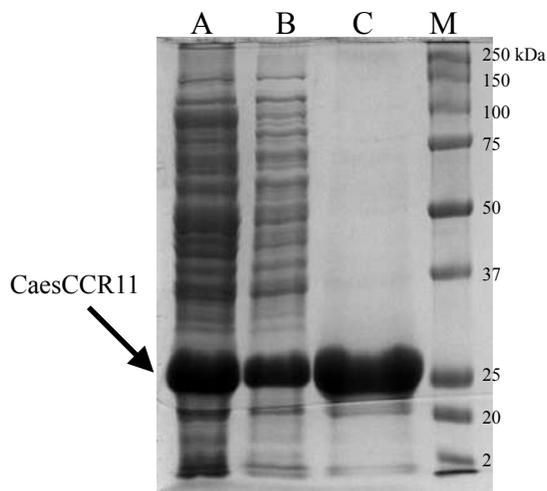


FIGURA 6.9 Electroforesis de gel de poliacrilamida al 14.5 % en condiciones disociantes del proceso global de purificación por electroforesis preparativa. Carriles (A) Extracto crudo, (B) Extracto térmico, (C) Extracto electroforético, (M) Marcador de peso molecular 161-0377 de BioRad.

Como puede apreciarse en la Tabla 6.6, la obtención del extracto térmico significa un incremento en la purificación y recuperación de CaesCCR11, sin embargo ambos valores disminuyen cuando se obtiene el extracto electroforético y el extracto enzimático. Dado que el factor de purificación se obtiene a partir de la actividad específica y el porcentaje de recuperación a partir de la actividad total, es necesario revisar lo que está ocurriendo con el cálculo de la actividad enzimática de CaesCCR11.

La técnica utilizada (sección 5.2.2) se realiza al cabo de 30 min de reacción, a 50 °C con *p*-nitrofenil laurato como sustrato. Estas condiciones son suficientes para que CaesCCR11 complete la reacción de hidrólisis. Lo que esté ocurriendo quizá no tenga que ver con el

ensayo de actividad en sí mismo, sino con el estado en el que se encuentra la enzima cuando se somete al ensayo de actividad, es decir, es posible que CaesCCR11 esté parcialmente inhibida después del proceso de purificación ya sea por acción del SDS o por la pérdida de su estructura terciaria con actividad catalítica .

Desde que CaesCCR11 se expresa en forma intracelular y se hace la lisis, incluso cuando se obtiene en el extracto térmico, es posible que no ocurran cambios fundamentales en su estado (según los resultados de purificación en la Tabla 6.6); sin embargo, en la electroforesis preparativa, después de haber estado entre 8 y 12 horas en contacto con el amortiguador de carga de la muestra, específicamente con el SDS, y bajo un campo eléctrico, es posible que la enzima sí sufra algún daño.

Aún más, la concentración por evaporación centrífuga tomó alrededor de 8 horas repartidas en tres o cuatro etapas, dependiendo de la concentración de proteína deseada; durante este proceso la fuerza iónica del amortiguador iba en aumento mientras que en la diálisis la fuerza iónica disminuía. Es posible que estos dos procesos provocaran alguna forma de des-plegamiento/re-plegamiento de la estructura de CaesCCR11. Estos posibles cambios pudieran explicar la caída en la recuperación de CaesCCR11 durante el proceso de purificación, por un lado la inactivación de la enzima por el SDS, por otro la formación de agregados al desplegar sus residuos hidrofóbicos.

### **6.5 Desagregación de CaesCCR11**

Con el objeto de tener la enzima en su forma más homogénea posible (no multimérica o agregada), se evaluaron posibles agentes que coadyuvaran en este sentido, tanto desde el extracto crudo para que no se agregara con otras proteínas contaminantes como en estado purificado para facilitar el proceso de cristalización.

### 6.5.1 Evaluación de agentes desagregantes en extracto crudo

En la Figura 6.10 se presenta el efecto sobre la actividad lipolítica (Panel A) y el tamaño de partícula (Paneles B y C) de distintos agentes que previenen la agregación en el extracto crudo de CaesCCR11: isopropanol al 5, 10, 30, 50 y 70 % (v/v); SDS al 0.1, 0.3 1 y 2 % (p/v) y Tritón X-100 al 0.4 % (v/v).

El isopropanol fue utilizado según Dünhaupt *et al.* (1992) en la purificación de una lipasa extracelular de *Pseudomonas cepacia* DSM 50181. Señaló que fue necesario adicionar el isopropanol en una concentración del 70 % (v/v) para mantener monomérica la enzima de 33 kDa, ya que sin éste, se registraban agregados de más de 1,000 kDa con actividad lipolítica en el volumen vacío de una columna de Sephacryl S-300 SF.

El efecto del isopropanol en el extracto crudo de CaesCCR11 no fue similar al reportado por Dünhaupt *et al.* (1992): a pesar de que éste incrementa su actividad en concentración del 10 y del 30 % (Panel A, Figura 6.10) el tamaño de partícula no se reduce con respecto al testigo (Panel B, Figura 6.10), nótese que en todos los casos el índice de polidispersión se mantiene inferior a 0.5. Más aún, a concentraciones más altas de isopropanol sobreviene la precipitación de las proteínas, de ahí que los valores reportados en la Figura 6.10 a las concentraciones de 50 y 70 % son los correspondientes al sobrenadante. Dada la baja en la actividad lipolítica (Figura 6.10, panel A), es posible que CaesCCR11 haya precipitado a estas altas concentraciones de isopropanol, sin embargo el análisis del precipitado no fue realizado porque CaesCCR11 precipitada ya no es útil en cristalización.

El análisis del efecto del SDS fue necesario para verificar lo que ocurrió durante la electroforesis preparativa sobre la actividad lipolítica de CaesCCR11. En la Figura 6.10, panel A puede verse como el efecto del SDS a baja concentración (0.1 % (p/v)) es positivo para la actividad de la enzima, sin embargo a concentraciones mayores la actividad decae significativamente.

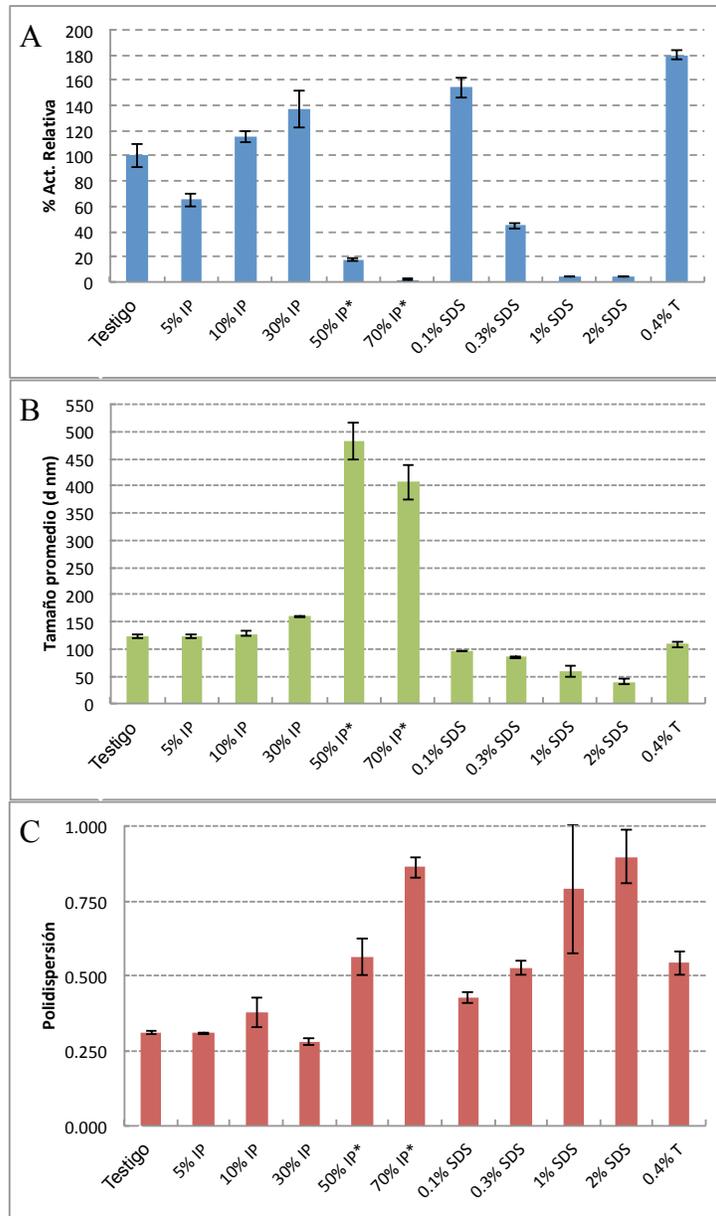


FIGURA 6.10 Estudios de desagregación de CaesCCR11 con isopropanol, SDS y Tritón X-100. (A) Porcentaje de actividad relativa con respecto al control de CaesCCR11 en extracto crudo, (B) Tamaño promedio del diámetro de las partículas de acuerdo con la intensidad medida por dispersión de luz dinámica y (C) Índice de polidispersión de las lecturas referidas en B de la dispersión de luz dinámica. IP: isopropanol, IP\*: hubo precipitación por lo que se presentan los resultados del sobrenadante, SDS: dodecil sulfato de sodio y T: Tritón X-100

Para llevar a cabo la electroforesis preparativa fue necesario una concentración del 2 % y ésta se redujo al 1%, aunque se trata de un valor todavía elevado, la cantidad de proteína presente era mayor: de 40 a 50 mg de proteína total en 10 mL de amortiguador de carga contra 20 mg de proteína total de este experimento. Sin desestimar la presencia del glicerol en el amortiguador de carga, que podría tener un efecto protector hacia CaesCCR11.

En cuanto al tamaño de partícula, éste se reduce progresivamente con el aumento en la concentración del SDS, sin embargo su índice de polidispersión se incrementa por arriba de 0.5 lo cual indica que se trata de una muestra polidispersa.

El Tritón X-100 es el que más incrementa la actividad de CaesCCR11, sin embargo, este valor debe ser tomado con precaución ya que este detergente interfiere con la lectura de la absorbancia en el ensayo espectrofotométrico. Por otra parte, el tamaño de partícula no es muy diferente del testigo y el índice de polidispersión está por encima de 0.5, esto es, podría decirse que el Tritón X-100 incrementa la actividad de CaesCCR11 pero no la desagrega, ni a ella ni a las proteínas contaminantes, a un tamaño de partícula menor y monodisperso con respecto al control.

Este resultado difiere con lo reportado por Velu *et al.* (2012), ellos purificaron una lipasa extracelular nativa de *Aeromonas caviae* AU04, reportan que en un gel de poliacrilamida en condiciones nativas la lipasa no pudo entrar al gel de empacamiento y también se eluía en el volumen vacío de una columna cromatográfica de exclusión molecular Zorbax GF-250 (Agilent); sin embargo, al estar en contacto por una hora a 30 °C con Tritón X-100 al 0.1%, la lipasa ya migraba en el gel de poliacrilamida nativo. Del mismo modo, la presencia del Tritón X-100 al 0.01 % (v/v) en el amortiguador de elución aumentaba el volumen en el que eluía la lipasa en la columna citada.

En el caso de los resultados encontrados para CaesCCR11, tanto en la precipitación por temperatura (sección 6.2) como en el retenido de la ultrafiltración (sección 6.3), es posible que el efecto del Tritón X-100 reportado por Velu *et al.* (2012) sea similar al efecto facilitador del flujo del extracto precipitado por temperatura y al efecto anti-película encontrado en el retenido durante la concentración por ultrafiltración. Es posible que el Tritón X-100 tenga un efecto lubricante entre las moléculas de proteína.

### **6.5.2 Evaluación de agentes desagregantes en CaesCCR11 purificada**

Para evaluar el efecto que tienen ciertos detergentes en la desagregación de CaesCCR11 en extracto purificado, después de la electroforesis preparativa y concentración por evaporación centrífuga, se prepararon soluciones de cada detergente con la enzima, de acuerdo con la metodología presentada en la sección 3.4.2. Para el análisis se midió la actividad enzimática, el tamaño de partícula mediante dispersión de luz dinámica y se tomaron micrografías de microscopía electrónica de transmisión.

Los resultados de actividad enzimática se presentan en la Tabla 6.7, ahí puede verse el efecto inhibitorio del SDS, el efecto disparador de la actividad que tiene el colato de sodio y que el efecto del Tritón X-100 al igual que el de ASB14 son ligeramente superiores al de la enzima sin detergente.

El incremento en la actividad de CaesCCR11 cuando está en contacto con el Tritón X-100 puede deberse al anillo presente en la cabeza hidrofílica del detergente, que interfiere con el ensayo espectrofotométrico (nótese que una muestra con Tritón X-100 sin la enzima dio positivo el ensayo de actividad, Tabla 6.7), es posible también que esta interferencia sea responsable sólo parcialmente del incremento en la actividad de CaesCCR11, dada la magnitud de la lectura obtenida en el ensayo sin proteína comparada con la muestra Tritón X-100/CaesCCR11 y la enzima sola.

TABLA 6.7 Efecto de los detergentes probados para la desagregación en la actividad enzimática de CaesCCR11. Los superíndices diferentes significan diferencia significativa. nd: no detectable.

Detergente	Actividad (U/mL)	Enzimática (%)	Hidrólisis sin CaesCCR11 (U/mL)
Tritón X-100	2,939.06 +/- 202.24 <sup>a</sup>	268	132.33 +/- 23.69
SDS	83.84 +/- 5.57 <sup>c</sup>	8	1.67 +/- 0.58
Colato de Sodio	11,103.47 +/- 755.85 <sup>d</sup>	1012	100.08 +/- 12.12
CHAPS	1,751.36 +/- 39.17 <sup>b</sup>	160	nd
ASB14	3,833.43 +/- 125.64 <sup>a</sup>	349	nd
Control (sin detergente)	1,097.12 +/- 113.48 <sup>b</sup>	100	-

El caso del colato de sodio es similar al del Tritón X-100 en el sentido de que el colato de sodio por sí mismo da lectura positiva en el ensayo de actividad (Tabla 6.7), sin embargo su magnitud es diferente cuando entra en contacto con la enzima. En este caso incluso podría ser despreciable la influencia del detergente en la hidrólisis del sustrato, dado que la actividad de CaesCCR11 se incrementa hasta diez veces cuando entra en contacto con el colato de sodio.

El CHAPS y el ASB14 incrementan la actividad de CaesCCR11 sin manifestar actividad hidrolítica por sí mismos. En los detergentes que incrementaron la actividad lipolítica de CaesCCR11, reportados en la Tabla 6.7, aún está por determinarse su forma de acción con la enzima. Quizá una parte de la respuesta se encuentra en la posibilidad de que una enzima desagregada tiene una mejor disponibilidad del sitio activo para el sustrato.

En los resultados del tamaño de partícula obtenidos por la intensidad de la dispersión de luz dinámica (Tabla 6.8) a diferencia de los resultados de la Figura 6.10 panel C, casi todos los índices de polidispersión son cercanos a 1. Esto sugiere que, al estar en forma pura, CaesCCR11 exhibe su tendencia a formar agregados sin interferencias de otras proteínas.

TABLA 6.8 Efecto de los detergentes probados para la desagregación en el tamaño de partícula de CaesCCR11.

Muestra	Z ave (d.nm)	PdI	Peak 1 Mean Int (d.nm)	Peak 2 Mean Int (d.nm)	Peak 3 Mean Int (d.nm)	Peak 1 Area Int (%)	Peak 2 Area Int (%)	Peak 3 Area Int (%)
Tritón X-100	854.4	1.000	695.6	0	0	100	0	0
Tritón X-100/CaesCCR11	488.5	0.842	448.3	0	0	100	0	0
SDS	482.5	0.297	904.6	231.5	0	70.7	29.3	0
SDS/CaesCCR11	648.3	1.000	581.1	0	0	100	0	0
Colato de sodio	774.7	1.000	670.4	0	0	100	0	0
Colato de Sodio/CaesCCR11	601.5	1.000	535.4	0	0	100	0	0
CHAPS	1376	1.000	976.4	0	0	100	0	0
CHAPS/CaesCCR11	515.3	0.622	483.5	0	0	100	0	0
ASB14		0.261	716.3	0	0	100	0	0
ASB14/CaesCCR11	827.8	1.000	700.8	0	0	100	0	0
CaesCCR11	425.1	0.405	411.7	0	0	100	0	0

El hecho de que los índices de polidispersión estén por encima de 0.5 obliga a poner atención en los picos de cada rango de tamaño y su representatividad como área bajo la curva (Apéndice F). Puede verse que, a excepción de SDS solo, existe un tamaño predominante en cada muestra y que de todos ellos el tamaño más pequeño es el testigo, es decir la enzima sin detergente. Sin embargo, enlazando los resultados de actividad de la Tabla 6.7, parecería que la composición de los agregados tiene un efecto diferenciado según el detergente empleado: el colato de sodio incrementa 10 veces la actividad con respecto a la enzima sola, aunque sus tamaños promedio quizá no sean muy diferentes pero sí más dispersos cuando está en presencia del colato de sodio que cuando está sola. El que no haya un tamaño más pequeño que el del control y también con menos dispersión pero que sí haya diferencias con la actividad lleva a suponer que es lo que realmente está sucediendo entre los detergentes y CaesCCR11.

En la Figura 6.11 se presentan las micrografías electrónicas de los agregados formados entre los distintos detergentes y la enzima. En los paneles (A, B, C, D, E) se muestran los agregados del detergente solo (lado izquierdo) y los agregados con CaesCCR11 (lado derecho). En el Panel F se presentan los agregados de CaesCCR11 sin detergente.

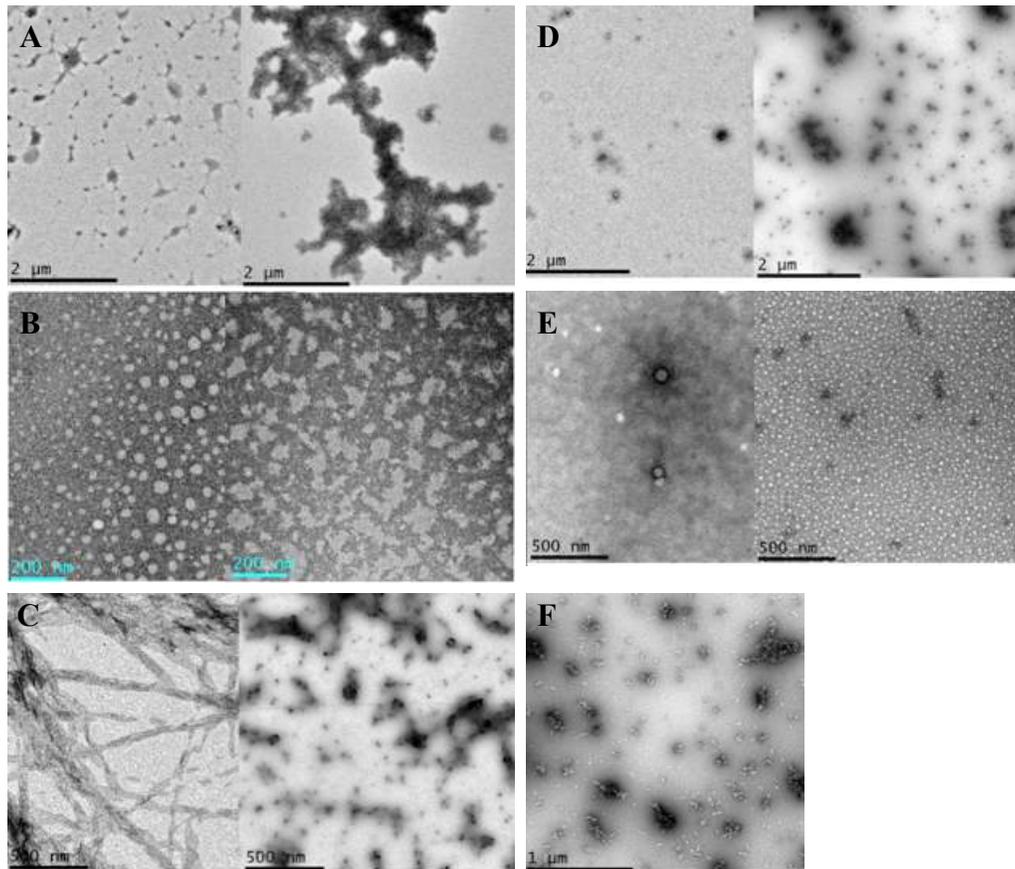


FIGURA 6.11 Micrografías de microscopía electrónica de transmisión de agregados de proteínas con detergentes. (A) Tritón X-100, (B) SDS, (C) Colato de Sodio, (D) CHAPS, (E) ASB14, el lado izquierdo es el detergente solo y el lado derecho el detergente con proteína. (F) CaesCCR11 sin detergente.

En el caso del Tritón X-100 (Panel A) se aprecia que, cuando está presente la proteína, los agregados son de mayor tamaño con respecto al detergente solo, lo mismo puede decirse para el SDS (Panel B) y para el CHAPS (Panel D). En el caso del colato de sodio (Panel C) se aprecian claramente las bicapas formadas por el detergente solo y los agregados cuando está en contacto con la proteína; para el ASB14 (Panel E) no es posible distinguir las micelas del

detergente por si solo ya que éste no tiene esa capacidad, lo que se distingue son artefactos del acetato de uranilo; en cambio cuando está presente la proteína, se forman agregados cualitativamente monodispersos, al menos en esa zona de la rejilla, muy diferentes a los que se forman con cualquier otro detergente probado. Esto permite sugerir que el ASB14 puede contribuir a la desagregación de CaesCCR11. En la Tabla 6.9 se presentan los tamaños de partícula a distinta concentración del detergente (10, 20 y 30 mM) en amortiguador Tris HCl 0.02 M, NaCl 0.1 M, pH 7.5. La proteína está a una concentración de 14 mg/mL.

TABLA 6.9 Efecto de la concentración del ASB14 en el tamaño de partícula de CaesCCR11 purificada.

<b>Muestra</b>	<b>Z Ave</b>	<b>PdI</b>	<b>Pk 1 Mean Int</b>	<b>Pk 2 Mean Int</b>	<b>Pk 3 Mean Int</b>	<b>Pk 1 Area Int</b>	<b>Pk 2 Area Int</b>	<b>Pk 3 Area Int</b>
	<b>d nm</b>		<b>d nm</b>	<b>d nm</b>	<b>d nm</b>	<b>%</b>	<b>%</b>	<b>%</b>
Testigo	63.12	0.452	702.9	2.64	58.06	34.5	32	29.2
Testigo	31.77	0.353	14.31	1154	5072	64.6	34.4	1
10 mM	90.8	0.353	10.87	296.4	5002	46.8	36.6	9.3
10 mM	29.03	0.427	14.04	553.5	4987	50.5	46.8	2.7
20 mM	46.19	0.291	7.388	243.5	5237	65.6	28.7	5.7
20 mM	17.82	0.490	8.257	393.3	4877	54.7	42.4	2.9
30 mM	106.8	0.271	9.699	398.1	5560	69	29.1	1.9
30 mM	14.5	0.397	11.66	336.5	3.31	43.8	25.8	24.3

Según los resultados para cada ensayo (0, 10, 20 y 30 mM de ASB14) presentados por duplicado (Tabla 6.9), puede verse que los índices de polidispersión están por debajo de 0.5 en todos los casos, sin embargo en las lecturas duplicadas se puede apreciar una alta desviación estándar, esto da una idea de lo compleja que resulta la muestra proteica para ser analizada por dispersión de luz dinámica. La concentración de ASB14 seleccionada fue 30 mM.

## 6.6 Cristalización de CaesCCR11

Una vez que se dispuso de CaesCCR11 en cantidad y concentración suficiente se inició con las pruebas de cristalización con el propósito de conseguir el cristal apropiado para la difracción tanto por rayos X como por electrones.

### 6.6.1 Exploración de condiciones de cristalización para CaesCCR11

La solución de proteína purificada obtenida para poner las condiciones de cristalización se presentan en la Figura 6.12. El amortiguador utilizado fue Tris HCl 0.02 M NaCl 0.1 M pH 7.5 adicionado con ASB14 30 mM, la concentración de proteína fue variable en función de la concentración lograda en el paso de la evaporación centrífuga.

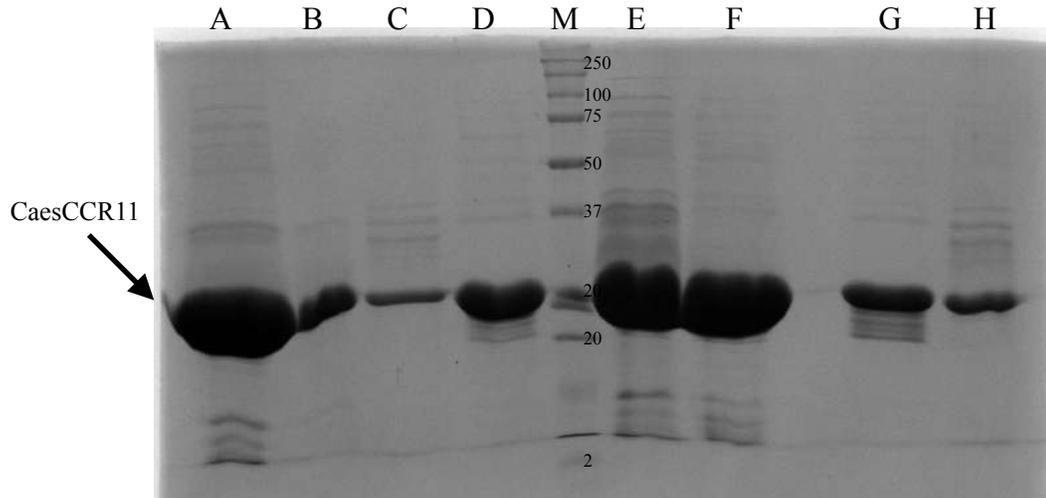


Figura 6.12 Electroforesis de gel de poliacrilamida al 14.5 % en condiciones disociantes de la proteína purificada lista para poner condiciones de cristalización. Carriles (A) 25.7 mg/mL, 170  $\mu$ L; (B) 8.2 mg/mL, 260  $\mu$ L; (C) 4.9 mg/mL, 210  $\mu$ L; (D) 11.8 mg/mL, 200  $\mu$ L; (M) Marcador de peso molecular 161-0377 de BioRad; (E) 19.9 mg/mL, 100  $\mu$ L; (F) 43.6 mg/mL, 220  $\mu$ L; (G) 7.2 mg/mL, 230  $\mu$ L y (H) 6.7 mg/mL, 230  $\mu$ L.

Las primeras condiciones de cristalización se pusieron con la técnica de micro lote, con los kits de cristalización de la Tabla 5.3 de la sección 5.5.1. Los resultados de esta exploración de condiciones de cristalización fueron cinco hits, todos en el mismo kit JB Screen Membrane 3 (CS-303L), después de cinco semanas de incubación a 18 °C, (Tabla 6.10).

Tabla 6.10 Condiciones de cristalización para CaesCCR11 del kit JB Screen Membrane 3 (CS-303L). Entre paréntesis está el número de la solución del kit.

Pozo	Precipitante 1	Precipitante 2	Amortiguador	Aditivo
A5 (5)	Sulfato de Amonio	Isopropanol	Ninguno	Acetato de Amonio
A6 (6)	Sulfato de Amonio	Ninguno	Ninguno	Ninguno
B1 (7)	Sulfato de Amonio	Ninguno	Citrato trisódico	Ninguno
C4 (16)	Ninguno	Ninguno	Fosfato de potasio dibásico	Ninguno
D1 (19)	Citrato trisódico	Ninguno	Ninguno	Ninguno

Los cristales que se formaron en estas condiciones se muestran en la Figura 6.13, fueron teñidos con 0.2  $\mu$ L de una solución de azul de metileno (HR4-710, Izit de Hampton Research) que penetra los túneles que dejan los cristales de proteína en su estructura interna. Los cristales inorgánicos no poseen estos túneles en el tamaño suficiente para que penetre el colorante.



FIGURA 6.13 Cristales de CaesCCR11 obtenidos a 18 °C después de cinco semanas, con las soluciones del kit JB Screen Membrane 3 (CS-303L)

El escrutinio de posibles condiciones de cristalización puede ser complicado cuando se trata de proteínas que forman agregados. Schlieben y colaboradores (2004) publicaron el estudio de una lipasa (BTL2) de *B. thermocatenuatus*, señalan que mas allá de la alta pureza lograda, la enzima precipitó de forma difusa en la mayoría de los pozos de cristalización, independientemente del agente precipitante, amortiguador o aditivos utilizados. Atribuyen la precipitación a una posible agregación no específica, por ello probaron 72 detergentes

diferentes para incrementar la solubilidad en los experimentos de cristalización y encontraron que LDAO podría ser el aditivo más prometedor.

Usaron LDAO en el amortiguador para concentrar por ultrafiltración con membrana de 30 kDa la enzima purificada y como aditivo en los experimentos de cristalización, sin embargo no lograron mejorar los resultados de la cristalización. Notaron que la presencia de LDAO no eliminaba la aparición de agregados cuando se concentraba la enzima purificada, un aparente peso molecular de 40 kDa en las soluciones diluidas cambiaba a 255 y 286 kDa cuando ésta se concentraba. Una mezcla de isopropanol con LDAO en distintas etapas de la concentración por ultrafiltración les dejó la enzima monomérica sin embargo no publicaron el resultado de la cristalización con estas modificaciones en el proceso de concentración de la proteína.

#### **6.6.2 Microcristales de CaesCCR11**

Se trabajó en la optimización de las cinco condiciones de cristalización obtenidas a las cinco semanas (Tabla 6.10) por medio de matrices (Apéndice E) en función de la concentración de la proteína y del precipitante. Los resultados obtenidos fueron microcristales que se presentan en la Figura 6.14.

Las solución proteica que produjo la mayor cantidad de micro cristales fue a 9 mg/mL en amortiguador Tris HCl 0.02 M pH 7.5 NaCl 0.1 M pH 7.5 y con ASB14 30 mM; la solución precipitante fue sulfato de amonio 1.5 M y el método fue la gota colgante colocando 1  $\mu$ L de la solución proteica, 1  $\mu$ l de solución precipitante para formar la gota y 1 mL de solución reservorio a 18 °C por 2 semanas. La solución reservorio es la misma que la solución precipitante, cuando se forma la gota colgante, el microlitro se toma directamente del pozo de la solución reservorio.

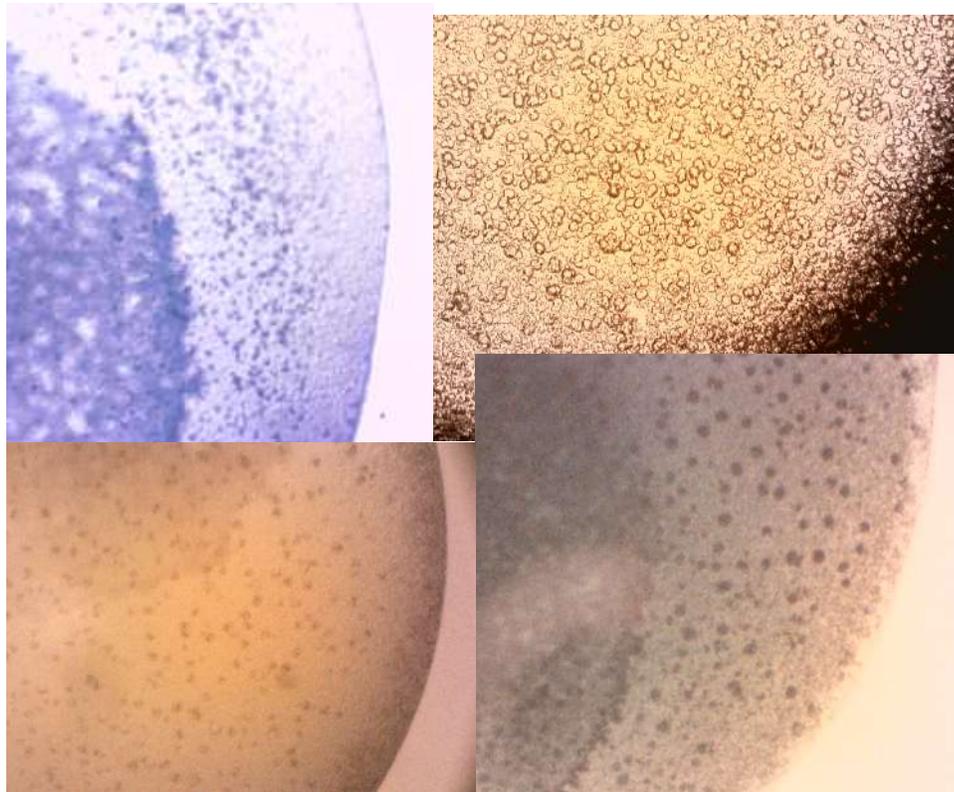


FIGURA 6.14 Microcristales de CaesCCR11 obtenidos a 18 °C después de dos semanas, con diversas optimizaciones de las soluciones del kit JB Screen Membrane 3 (CS-303L).

Estos microcristales pueden ser apropiados para la difracción por electrones en un microscopio electrónico de transmisión, la condición principal es su tamaño alrededor de 200 nm, de ahí que se insistió en la obtención de los micro cristales para enviarlos a difractar en el microscopio electrónico.

Entre los cambios aplicados en la optimización realizada se modificó el tiempo de incubación: si los microcristales eran visibles con microscopio estereoscópico (Figura 6.14) a las dos semanas, entonces su tamaño era superior a los 200 nm requeridos. Los cristales obtenidos a menor tiempo de incubación son aún pequeños de acuerdo al tamaño necesario para hacer la difracción de electrones (Figura 6.15, panel B).

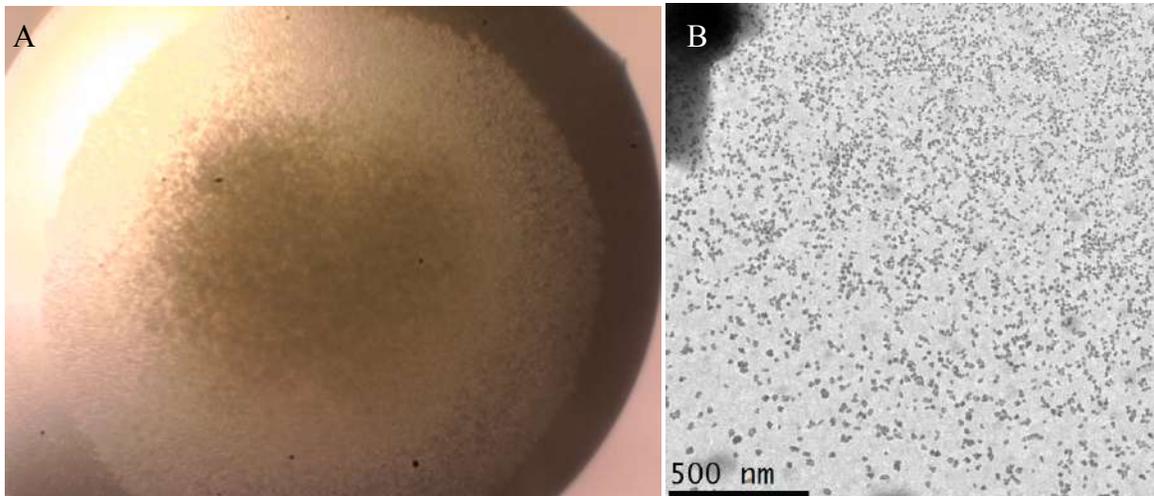


FIGURA 6.15 Microcristales de CaesCCR11 obtenidos a los cuatro días de incubación. (A) fotografía de microscopio estereoscópico y (B) micrografía de microscopio electrónico de transmisión.

En función de los resultados obtenidos para microcristales, se preparó una caja de cristalización para difractar al microscopio electrónico de transmisión de la Universidad de Texas. La caja fue puesta por la técnica de la gota colgante durante dos semanas y transportada con geles congelados.

Se observaron las gotas de cristalización en el microscopio óptico digital Olympus DSX500. Los resultados indicaron la presencia de proteína precipitada y agregados proteicos (Figura 6.16).

Después de verificar el estado de los cristales con el microscopio óptico, se prepararon unas rejillas de cobre de 300 mallas con recubrimiento de carbono, previamente irradiadas con luz UV. Debe mencionarse que la preparación se realizó depositando 4  $\mu\text{L}$  de la muestra cara arriba sobre la rejilla, con un tiempo de secado de 4 min y retirando el exceso con papel filtro, repitiendo la aplicación con más muestra y una tercera aplicación con acetato de uranilo.

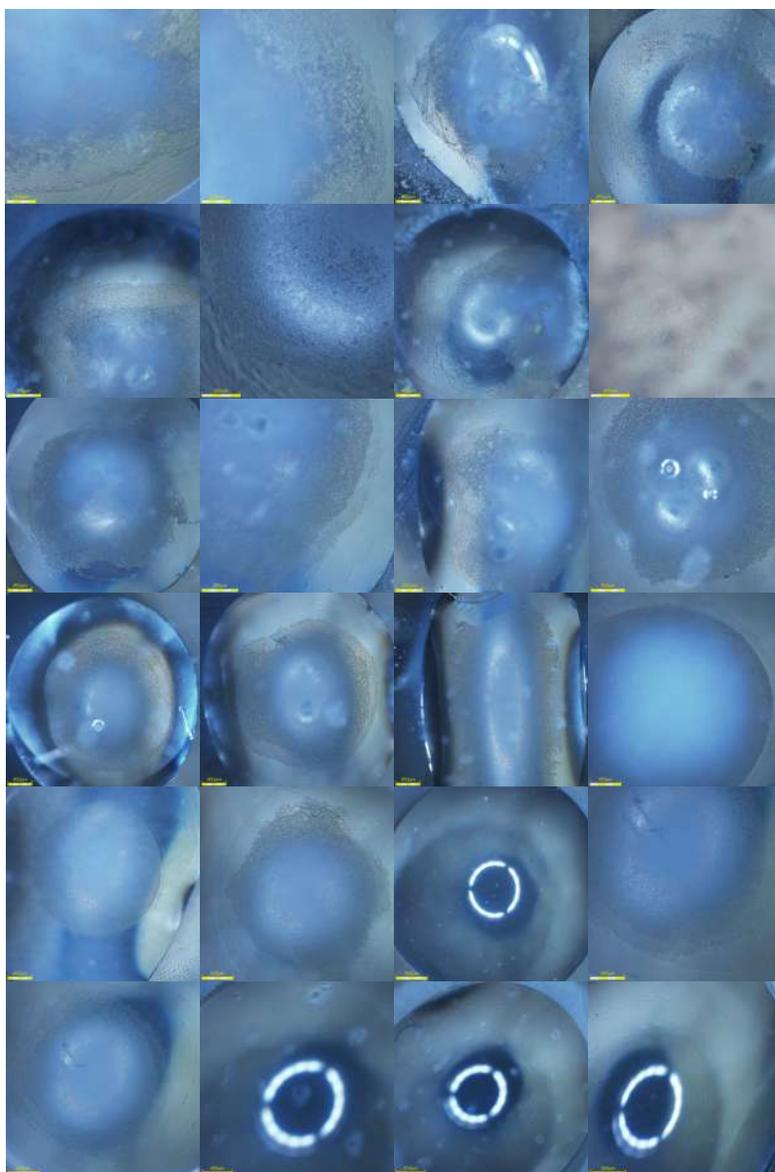


FIGURA 6.16 Fotografías de microscopio óptico digital Olympus DSX500 de los pozos de la caja de cristalización de CaesCCR11 por gota colgante, llevados a la Universidad de Texas.

Las rejillas preparadas con las muestras de las gotas de cristalización se observaron en el microscopio electrónico de barrido ZEISS GeminiSEM a 30 kV, sin tinción negativa de uranilo. En la Figura 6.17, se aprecia la presencia de grandes cristales de sales inorgánicas, presumiblemente de sulfato de amonio.

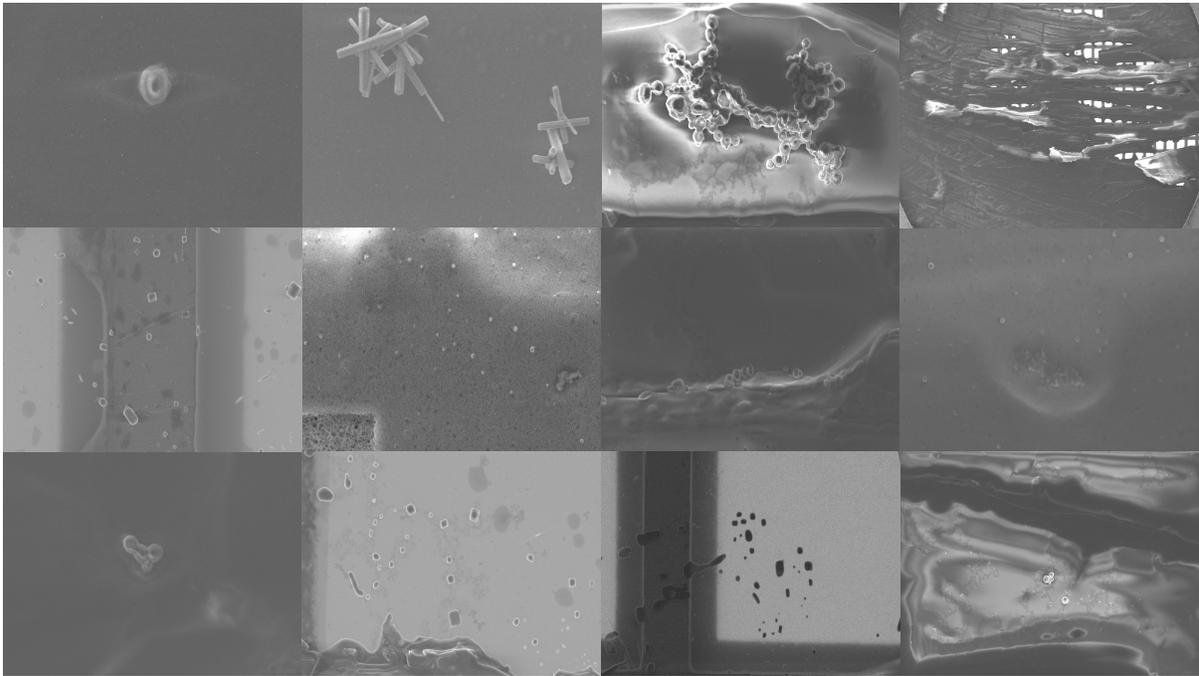


FIGURA 6.17 Micrografías de microscopía electrónica de barrido (ZEISS GeminiSEM) de las gotas de cristalización colocadas en rejillas de cobre de 300 mesh con recubrimiento de carbono.

Se buscó un crioprotector para congelar los microcristales en eteno mediante crioinmersión automatizada, debía ser un agente que no dañara los microcristales, se probaron glucosa, sacarosa, etilen glicol y glicerol, todos al 30 %. Al momento de mezclar el crioprotector con la gota de cristales, los de sacarosa y glucosa más o menos lo soportaron, en cambio los de etilén glicol y glicerol disolvieron o fundieron los microcristales.

Las micrografías de microscopía electrónica de barrido de los microcristales con el crioprotector se muestran en la primera columna de la Figura 6.18, puede verse que la saturación de la rejilla de cobre con la solución de cristales en conjunto con el crioprotector, provoca la formación casi instantánea de sales tanto de la solución precipitante (sulfato de amonio) como del respectivo crioprotector, obsérvense las numerosas barras presentes sobre la superficie de la rejilla y que son de gran tamaño. Estas barras también se aprecian en algunos

recuadros de la Figura 6.17 pudiendo atribuirse al sulfato de amonio o al cloruro de sodio presente en la solución de cristalización.

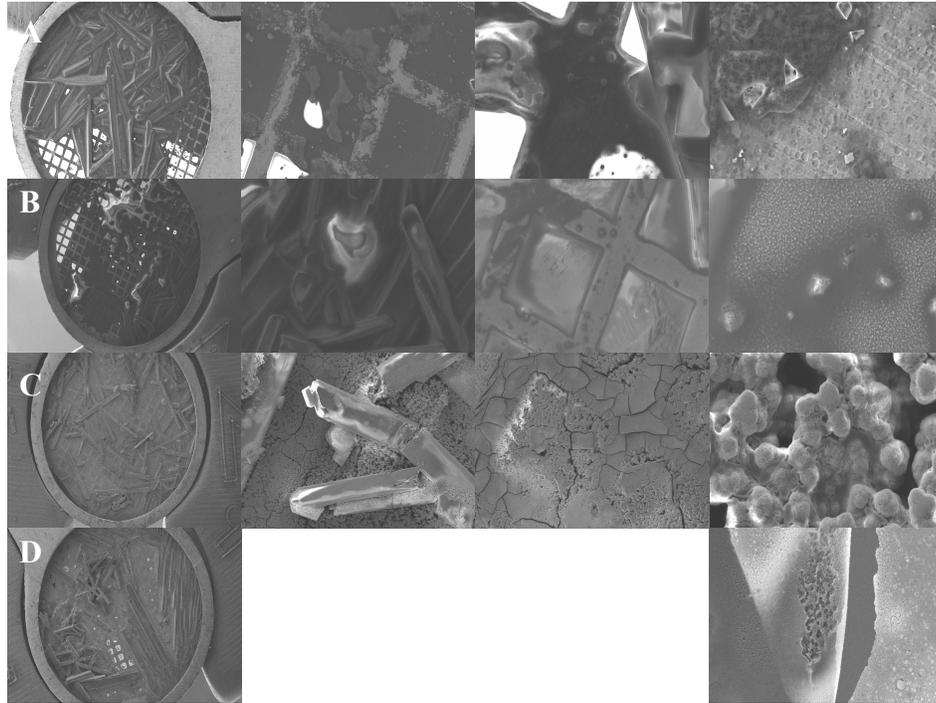


FIGURA 6.18 Micrografías de microscopía electrónica de barrido de las gotas de cristalización con diferentes crioprotectores al 30 %, colocadas en rejillas de cobre de 300 mesh con recubrimiento de carbono. Filas: (A) sacarosa, (B) glucosa, (C) etilén glicol y (D) glicerol.

Dados los resultados obtenidos con las soluciones para crioprotección y puesto que la metodología de crioinmersión en eteno aún debía estudiarse, la parte final del trabajo realizado en la Universidad de Texas consistió en la observación directa de las gotas de cristalización en el microscopio electrónico de transmisión, sin acetato de uranilo, sin crioprotector y sin el procesamiento de crioinmersión en eteno, estas micrografías se muestran en la Figura 6.19 donde puede apreciarse lo que posiblemente sean cristales de proteína dañados o agregados proteicos.

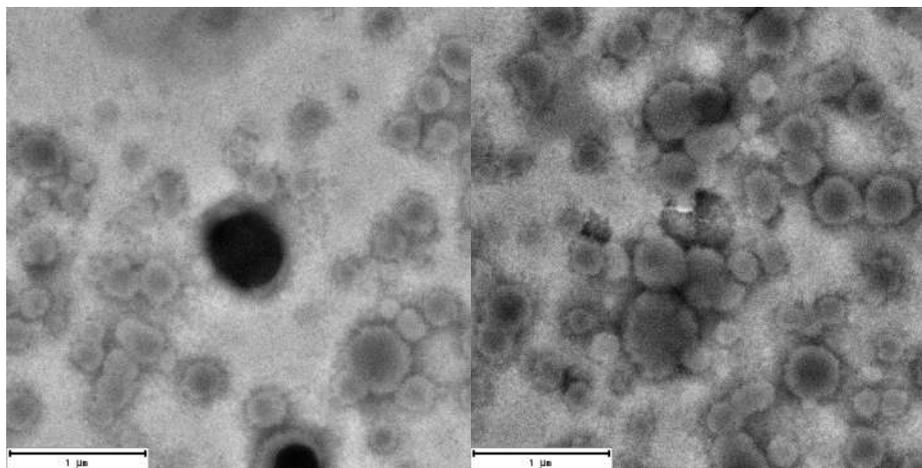


FIGURA 6.19 Micrografías de microscopía electrónica de transmisión (JEOL JEM 2010F) de las gotas de cristalización donde se aprecia la presencia de cristales de proteína dada su vulnerabilidad diferente de los cristales inorgánicos.

Stevenson y colaboradores en 2014 publicaron un estudio para detectar nanocristales de proteínas que, en la cristalografía clásica para difractar por rayos X, son desechados desde la búsqueda de la condición de cristalización. Ellos seleccionaron por microscopía de campo brillante aquellas condiciones donde hubiera agregados granulares y gotas claras. Los agregados granulares fueron examinados por microscopía de fluorescencia (JANSi UVEX) para detectar aquellos que contuvieran triptofano y fueran de naturaleza proteica; las gotas claras fueron examinadas por dispersión de luz dinámica (Wyatt DynaPro con lector de placas) para asegurar que hubiera presencia de nanopartículas; las pruebas que dieron positivo en uno u otro método, fueron observadas por microscopía electrónica de transmisión (FEI Tecnai T12).

En algunas de las muestras que fueron observadas por microscopía electrónica de transmisión fue posible ver tanto el nanocristal, como la red cristalina y determinar la transformada de Fourier. Los autores reportan que no hubo interferencia en el análisis de microscopía electrónica de transmisión por parte de los detergentes usados en las pruebas de cristalización. La calidad de la red cristalina permitió detectar falsos positivos, es decir los

cristales de sales inorgánicas y los agregados proteicos haciendo de cobertura en los cristales inorgánicos.

En dos de las muestras examinadas (la acil transferasa trans-activa de la disorazol sintasa y la RNA polimerasa II en complejo con la proteína verde fluorescente) fue posible obtener el patrón de difracción con resolución de 1.8 y 4.0 Å respectivamente, por el método de láser de electrones libres X-FEL en la estación terminal de imagen coherente de rayos-X (CXI) de la fuente de luz coherente Linac (LCLS) de la fuente de radiación de sincrotrón de Stanford (SSRL).

Siguiendo con la publicación de Stevenson y colaboradores (2014) ellos probaron 8 proteínas para cristalizar: 1 soluble, 3 de membrana y 4 en complejo con dos o más proteínas. Es importante notar que reportan la existencia de una concentración máxima para cada proteína que la deja monodispersa, es decir, si se supera esa concentración la proteína se hace polidispersa, dicha concentración varía para cada proteína probada y va desde 1.5 hasta 8 mg/mL.

### **6.6.3 Cristal unitario de CaesCCR11**

De las condiciones puestas inicialmente en el apartado 6.6.1, creció además un monocristal después de 10 meses de incubación a 18 °C. Este cristal creció en el pozo C6 condición 33, kit HR2-114 de Hampton Research, con la formulación: Sulfato de Amonio 0.1 M, HEPES de Sodio pH 7.5 0.1 M y PEG 400 al 18% v/v, que coinciden con los 5 hits hallados a las cinco semanas de incubación (Tabla 6.10).

Se preparó un crioprotector con la misma composición de la solución precipitante, sólo cambiando el PEG 400 al 40%. El cristal se almacenó en nitrógeno líquido y se llevó a difractar por Rayos X a la estación sincrotrón de la Universidad de Stanford (SSRL) el 11 de octubre de 2016 y el resultado fue que el cristal no emitió ningún patrón de difracción.

Las limitaciones por las que un cristal de proteína no emite un patrón de difracción radican en las variaciones conformacionales dentro de las macromoléculas, la equivalencia inexacta de ensamblajes grandes, la variabilidad en el empacamiento y/o, además por defectos convencionales en las redes cristalinas: bloques de mosaico, fallas en el apilamiento, dislocaciones y defectos puntuales debidos a impurezas, espacios vacíos y aglomerados. Los esfuerzos inducidos por estos defectos pueden producir cambios conformacionales en las macromoléculas o desorden en su empacamiento. (Chernov, 2003)

La no obtención del patrón de difracción del cristal también puede deberse a que los planos dentro del cristal no están orientados y las señales se anulan. Un cristal puede desarrollar un proceso de desorden a partir del cambio en su microambiente, ya sea por la adición de un crioprotector o por el cambio de su temperatura. También puede desordenarse si tuvo un crecimiento rápido, los planos del cristal no se ordenaron. (Dr. Enrique Rudiño Piñera, comunicación personal)

## **6.7 Desorden de CaesCCR11**

Con los microcristales de CaesCCR11 no pudo llegarse a la observación de la red cristalina mediante la difracción de electrones y con el monocristal aunque si se obtuvo un cristal de proteína del tamaño apropiado, no pudo obtenerse un patrón de difracción. Para favorecer el crecimiento ordenado, se probó un kit de aditivos de Hampton Research (HR2-428) sin obtener una condición de cristalización.

Para evaluar el desorden de CaesCCR11 se preparó una muestra de la proteína (Qian *et al.*, 1989) en solución con el amortiguador Tris HCl 0.02 M pH 7.5, se liofilizó y se rehidrató con agua deuterada para hacer un análisis de resonancia magnética nuclear. El resultado es un espectro en una dimensión que se presenta en la Figura 6.20.

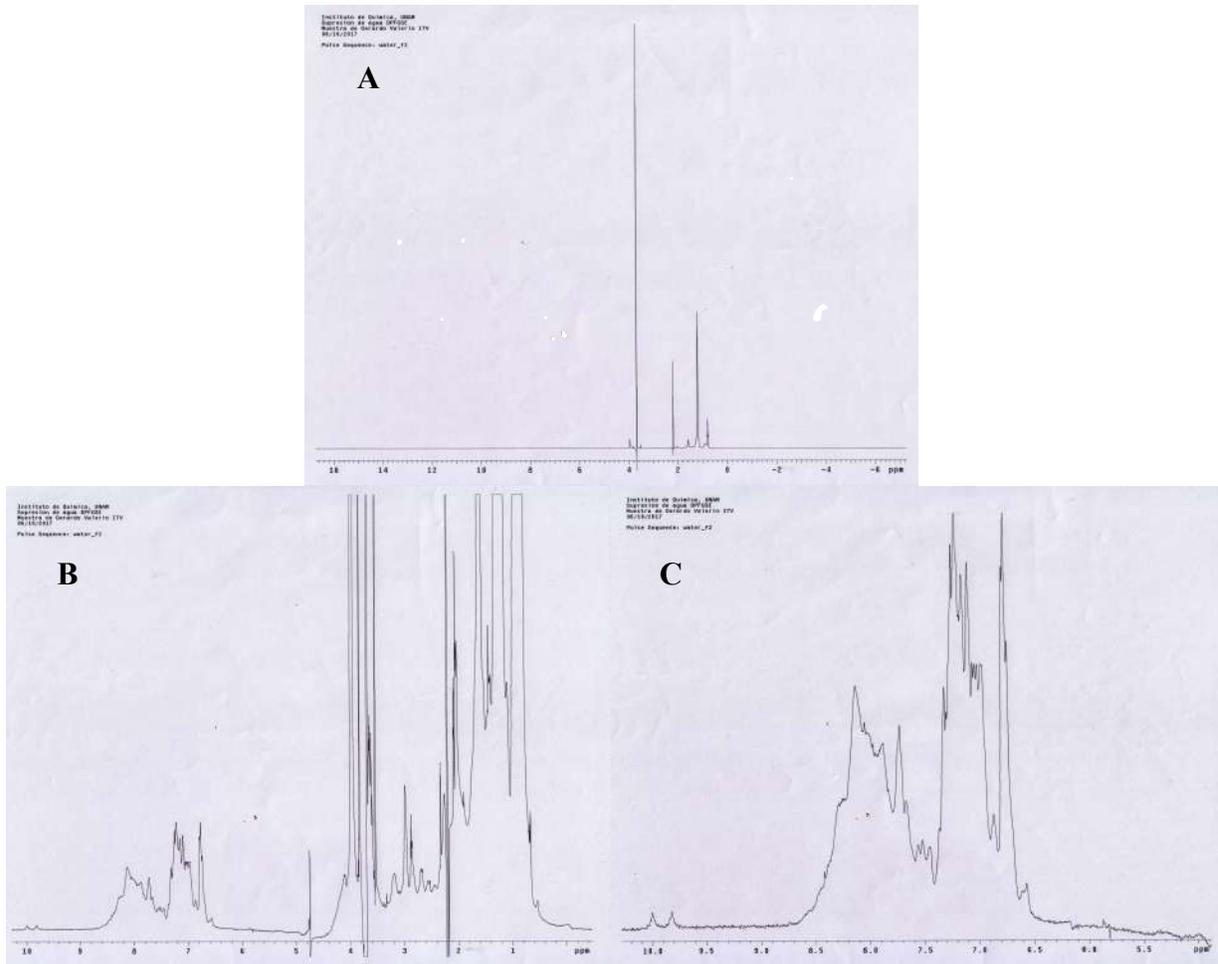


FIGURA 6.20 Espectros 1D, 500 MHz, 25 °C, secuencia de pulsos de supresión de agua DPGSE y 256 transientes de la proteína en solución CaesCCR11 en amortiguador Tris HCl 0.02 M pH 7.5.

En el panel A de la Figura 6.21 puede observarse que las señales de absorción de los protones de la proteína son imperceptibles ante la intensidad de la señal que generan los protones del amortiguador Tris HCl. En las secciones ampliadas B y C se presenta la zona en la cual deberían observarse las señales atribuidas a los puentes de hidrógeno que estabilizan los plegamientos de estructura secundaria. Lo que se aprecia es una mezcla compleja de multiseñales sobrepuestas, no pudiendo definirse las posibles señales provenientes de un tipo de protones. Lo que puede concluirse acerca de lo observado en los espectros de la Figura 6.20 es el desorden provocado por la falta de arreglo en la estructura. Este resultado lleva a la

suposición de que quizá CaesCCR11 sea una proteína clasificada como intrínsecamente desordenada.

Para estimar la probabilidad de desorden de CaesCCR11, se hizo una comparación de ésta con la fosfoproteína soluble tilacoidal. La predicción del desorden se hizo en PrDOS (Ishida y Kinoshita, 2007) y los resultados muestran (Figura 6.21) que CaesCCR11 tiene apenas una predicción de 14 aminoácidos desordenados de 250 en total.

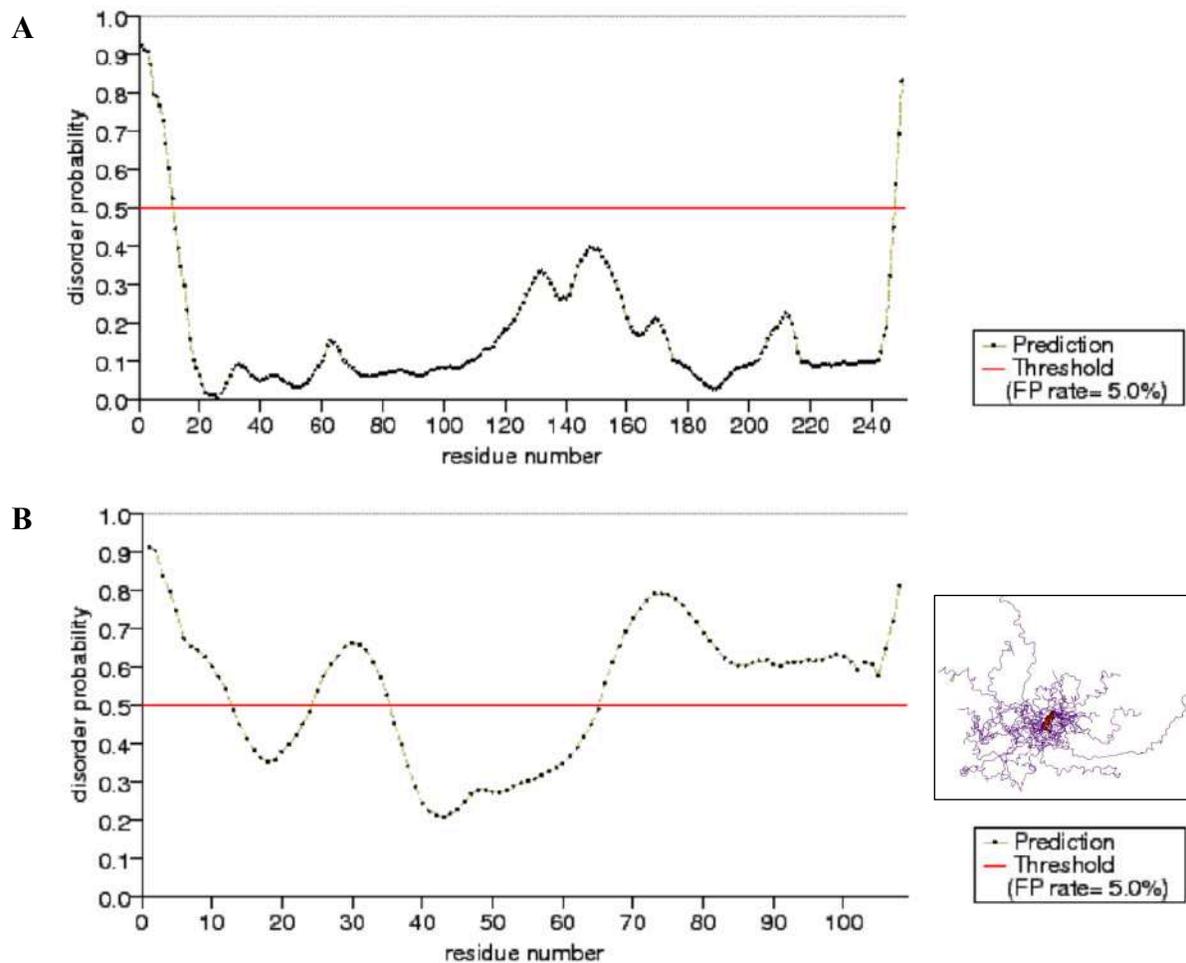


FIGURA 6.21 Predicción del desorden en la proteína a partir de la secuencia de aminoácidos. (A) CaesCCR11 y (B) Fosfoproteína soluble tilacoidal. La predicción se hizo con PrDOS. FP:falso positivo.

Por otra parte se ha identificado a CaesCCR11 como poseedora del plegamiento  $\alpha/\beta$  hidrolasa, (Ollis *et al.*, 1992) con hojas- $\beta$  y hélices- $\alpha$  definidas y responsables de la cercanía de la triada catalítica. Por el contrario, la fosfoproteína soluble tilacoidal, cuya estructura fue resuelta por RMN (Song *et al.*, 2006; PDB 2FFT) posee 66 aminoácidos desordenados de 106 en total con apenas una pequeña hélice alfa definida. La estructura tridimensional de la proteína, permite ver una serie de cadenas polipeptídicas sin estructura.

Puede decirse que CaesCCR11 sí tiene estructura, no es una proteína intrínsecamente desordenada, sin embargo tanto en el resultado de la difracción por rayos X en el monocristal de la sección 6.6.3, como en el resultado del espectro por RMN de la proteína en solución, está de manifiesto un desorden no esperado de acuerdo a la estructura primaria de CaesCCR11 y su análisis *in silico*. (Espinosa-Luna *et al.*, 2016)

El origen de dicho desorden puede estar entonces en el proceso de purificación de CaesCCR11, donde además se ha manifestado una disminución tanto del factor de purificación como del porcentaje de recuperación (Tabla 6.6). Puede ser atribuido al SDS en la electroforesis preparativa o los cambios en la fuerza iónica del amortiguador en la concentración centrífuga y la diálisis.

## **6.8 Predicción de la estructura terciaria de CaesCCR11**

Se realizó una predicción de la estructura terciaria de CaesCCR11 por medio del servidor RaptorX de la Universidad de Chicago, a partir de la secuencia de aminoácidos el programa busca un templado de la base de datos, en este caso fue el 4KE6 correspondiente a una monoacil glicerol lipasa producida por *Bacillus* sp. H-257 (Rengachari *et al.*, 2013).

El modelo obtenido se presenta en la Figura 6.22, donde puede apreciarse que CaesCCR11 posee seis hélices- $\alpha$  y siete hojas- $\beta$  del plegamiento canónico  $\alpha/\beta$  hidrolasa; un dominio de tapa que comprende 44 residuos conformado por dos hojas- $\beta$  y dos hélices- $\alpha$ ; un

agujero oxianión formado por Phe 29 y Met 98 que brinda estabilidad al intermediario tetrahédrico; la triada catalítica integrada por Ser97 (ubicada en el codo nucleofílico entre  $\beta$ 5 y  $\alpha$ 3), Asp 196 e His 226; un núcleo hidrofóbico que entra en contacto con la cadena acil del sustrato integrado por Phe29, Ile125, Ile128, Leu142, Leu167, Leu170, Met174 y Val 198 y ocho puentes de sal que están relacionados con la estabilidad térmica (Glu3-Arg54, Glu12-Arg37, Glu66-Arg140, Glu78-His110, Asp124-Lys178, Asp148-His197, Asp194-Arg222 y Asp205-Arg220) (Rengachari *et al.*, 2013; Charbonneau y Beauregard, 2013).

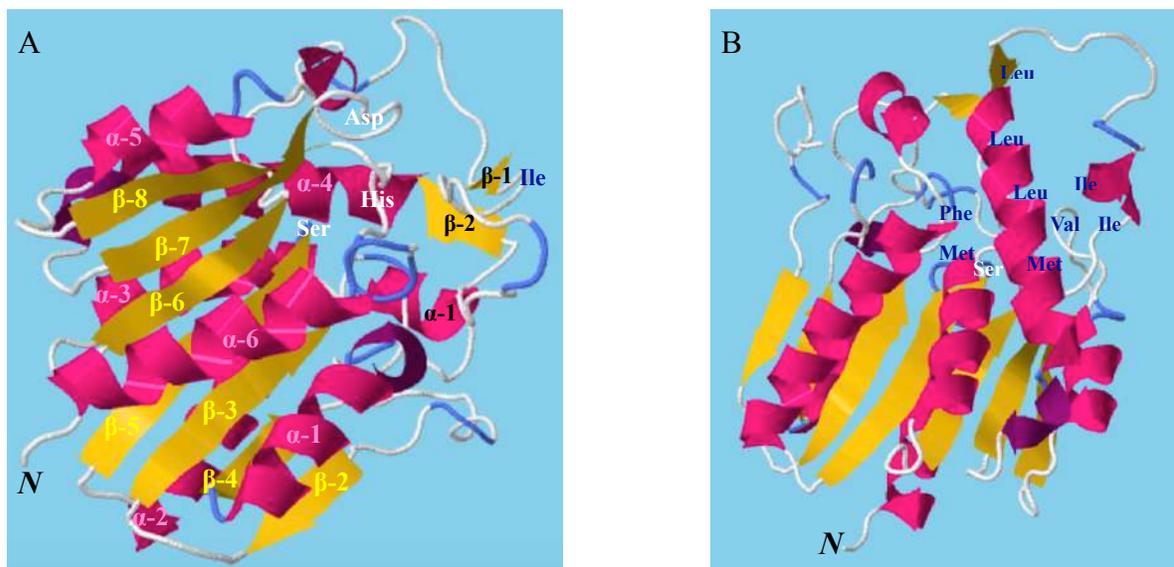


FIGURA 6.22 Predicción de la estructura terciaria de CaesCCR11 con el servidor RaptorX de la Universidad de Chicago. (A) Modelo con las seis hélices alfa ( $\alpha$ -1 hasta  $\alpha$ -6) y siete hojas beta ( $\beta$ -2 hasta  $\beta$ -8) que conforman el plegamiento desviado ligeramente del canónico  $\alpha/\beta$  hidrolasa, donde está faltante la  $\beta$ -1 antiparalela a  $\beta$ -2; la triada catalítica Ser-97, Asp-196 e His-226 (rótulos en color blanco); el dominio de la tapa  $\beta$ -1,  $\beta$ -2 y  $\alpha$ -1 (rótulos en color negro) y la Ile-145 que presenta movilidad facilitando el acceso al sitio activo (Rengachari *et al.* 2013). (B) Modelo con el núcleo hidrofóbico que entra en contacto con la cadena acil del sustrato conformado por Phe-29, Ile-125, Ile-128, Leu-142, Leu-167, Leu-170, Met-174 y Val-198. En color blanco la Ser-97 catalítica en el codo nucleofílico, junto la Met-98 que forma el agujero oxianión con la Phe-29 próxima, para estabilizar el el intermediario tetrahédrico por puentes de hidrógeno. (Espinosa-Luna *et al.*, 2016)

Los parámetros que describen la calidad del modelo generado se presentan en la Tabla 6.11, donde puede verse que las puntuaciones indican que el modelo obtenido es de buena calidad.

TABLA 6.11 Puntuaciones de calidad del modelo obtenido para CaesCCR11.

Parámetro	Valor obtenido	Explicación
P-value	4.63E-08	El número más pequeño es mejor.
uGDT(GDT)	233 (93)	Test de distancia global, sin normalizar y normalizado. Mayor a 50 es mejor.
uSeqId(SeqId)	246 (98)	Es el número de residuos idénticos, sin normalizar y normalizado.
Score	257	Es la puntuación de alineación que oscila entre 0 y la longitud de la secuencia, donde 0 indica lo peor.

## 6.9 Caracterización molecular de CaesCCR11

Se analizó *in silico* la ubicación y organización del gen que codifica para CaesCCR11 en el genoma completo de *Geobacillus thermoleovorans* KCTC (NZ\_C014335.1) en la base de datos de NCBI. Se encontró que el promotor está 714 pb por arriba del codón de inicio de *caesccr11*. El fragmento encontrado se evaluó con el servidor FGENSEB de Solovyev y Salamov (2011) que predice genes, unidades de transcripción y operones a partir de la secuencia de nucleótidos. El resultado obtenido fue que *caesccr11* forma un operón con el gen de una proteína desconocida DUF que tiene 167 residuos, un peso molecular de 18,525 Da y *pI* de 9.67 (servidor ExPASy de Gasteiger *et al.*, 2005).

Para verificar si el hallazgo encontrado *in silico* también estaba presente en el genoma de la cepa de estudio, se extrajo el ADN cromosómico de *G. thermoleovorans* CCR11 y se amplificaron las regiones de acuerdo a la metodología descrita en las secciones 5.6.2 y 5.6.2.1. El resultado de la electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1 % con la amplificación de la PCR se presentan en la Figura 6.23.

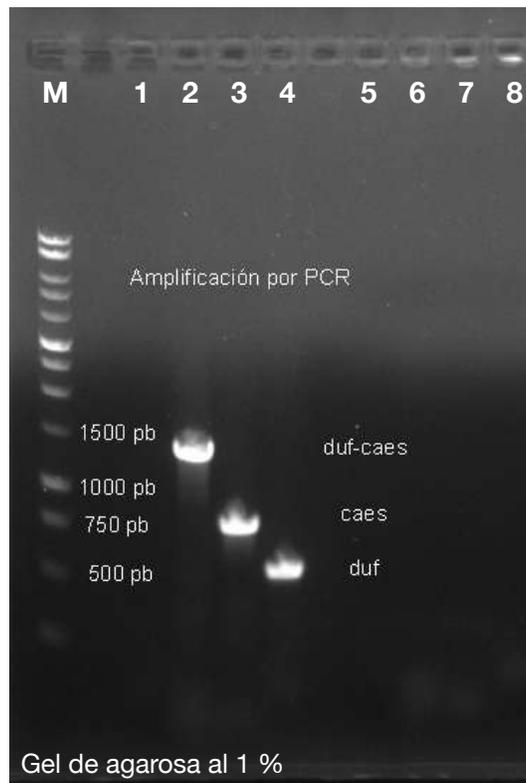


FIGURA 6.23 Electroforesis horizontal de gel de agarosa al 1 % de los productos amplificados por PCR usando el ADN de *G. thermoleovorans* CCR11 como templado y los oligonucleótidos iniciadores directo y reverso para los genes de *caescr11* y *duf*. (M) Marcador, (1) directo de *caescr11* y reverso de *duf*, (2) directo de *duf* y reverso de *caescr11*, (3) directo y reverso de *caescr11*, (4) directo y reverso de *duf*, (5, 6 7 y 8) los mismos que en (1, 2, 3 y 4) sin ADN templado para verificar la hibridación de los oligonucleótidos iniciadores.

Puede verse la amplificación tanto de los genes por separado (Figura 6.23, carriles 3 y 4) como juntos (carril 2) cuando se usó el oligonucleótido iniciador directo de *duf* y el reverso de *caescr11*, dando que se encuentra primero el gen *duf* y a continuación el gen *caescr11*. Los oligonucleótidos iniciadores no se hibridan según el resultado de los carriles 5 al 8, donde se colocaron las mismas condiciones que en los carriles 1 a 4 excepto porque no se adicionó ADN templado.

Se procedió a la secuenciación del fragmento amplificado con ambos genes juntos en la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN del Instituto de Biotecnología de la UNAM. El resultado de la secuenciación se presenta en la Figura 6.24, ahí puede verse en negritas el complemento tomado del genoma completo de *G. thermoleovorans* KCTC que flanquea la zona secuenciada a partir del producto amplificado por PCR. En subrayado está el promotor que fue predicho con los servidores BDGP y BPRM. Puede apreciarse que no hay predicción de un promotor en la zona entre el fin de *duf* y el inicio de *caescr11*.

```

>operón duf-caes
      GTTGGC AAGCGGAGAT CGTTTTGCTT TCATTTGCTT CACTCCTTAT TAGCGTTGTG TACTTTTAAC
TATAGCCATG ATGTCAATAA CGCGATGTTA ACTTTGTAC ACCTTGGCATC ATTGTCACAA ATCCGTCAAA
GAAACGAACA AATATTCTTT TCTGTGGTAT AATGGGGAAA ACGATAAAAAG TTTGAGGGGA TTTTCGTTGCG
ATACTCCAGC CATGTCATTG CCACATTATG CCTCGGGCGG GCGGCGGGCCG CGCATAACAA GCTGCCGTTT
ACCGCCGCTT ATACGGCGGG GCTTGTATC GGCAGCCTTC TTCCTGACAT TGACGAGCCG TCGTCATACG
TCGGCCGCGG TTCGTTCCGG GTCGCGGGGA AAGTAAAAGA AGCGTTCGGC CATCGCGGCA TGACGCATTC
GCTCATCGTC TGGGGGGTGC TTGCCGCCCT CGTCTGGCGC GACTCGGCGT CGCCGTTTAC CGCTGGGCTC
GTGCTCGGCT ACTTGTTTCA TATTGTGGAA GACTTTTTTT CTGTTCAAGG GGTGCCGCTG TTTTGGCCGT
TTTCGTCCAA GCGGTGGAAA GTGCCGCTCT ATCGGACGGG AAAAGGGATG GAGAAAGCAT TGGTTGGCAT
CGCTTGGATC GCATTCGTCT ATTTTGGCGT CAACGGCTTG TTTCACGAAT GGTGGCGGTC ATGGTTGTCTG
ATGTPGGTAA GCGCTCCGAT CAAAAAAGGA AAAAAGAGGT GCGGCGGGCA ATATAGTGAG AGGAACGGAT
TTGACTAGAT AAGGGGGAGA GGAAGATGAG CGAACAATAT CCGGTGCTCT CGGGCGCCGA GCCGTTTTAC
GCCGAAACG GGCCGGTCGG GGTGCTGCTC GTGCACGGAT TCACCGGCAC GCCCCACAGC ATGCGCCCGC
TCGCTGAAGC GTATGCGAAA GCCGGCTATA CCGTTTGCCT GCCGCGCTTA AAAGGGCAGC GAACGCATTA
CGAAGACATG GAACGGACGA CATTCCACGA TTGGGTCGCC TCGGTGCAAG AAGGATATGG ATGGCTGAAA
CAACGATGCC AAACATTTT TGTCCACGGG CTGTGATGG GCGGGACGCT CACGCTTTAT TTGGCGGAAC
ATCACCCAGA CATCTGCGGC ATCGTGCCGA TTAACGCCGC TGTGACATC CCGGCCATCG CCGCCGGGAT
GACGGGCGGG GGCGAGCTGC CGAGGTATCT GGATTCGATC GGTTCCGACT TGAAAAATCC GGATGTGAAA
GAGCTGGCAT ACGAGAAAAC GCCGACCGCT TCGCTTCTTC AGCTGGCTAG GCTGATGGCA CAGACAAAAG
CGAAACTCGA TCGCATCGTC TGTCCGGCGT TGATTTTTGT CTCCGACGAA GATCACGTCG TGCCGCCGGG
AAACGCCGAC ATCATCTTTC AAGGCATTTT ATCGACGGAG AAAGAGATCG TCCGCCTCCG AAACAGCTAC
CATGTGGCGA CGCTCGATTA CGACCAACCG ATGATTATTG AACGGTCTCT CGAATTTTTT GCCAAGCAGC
CCGGATAAAA CGAATCGGTA TATGGCTGAT CCTGTTCAAA GGAGAGGCCA TTTTTTGTTC GTCGGTATTT
TTGTGAAAAA ATATGTGGCT GTTTTGCCGG GCTTGTCTTA CACTTATAAA TAGCTGGAAA AAGAATAAGG
GAGTTTCTT TGTATGAATC ATATCAAACC GATCGCATTG CTCGT

```

FIGURA 6.24 Secuencia del operón *duf-caescr11*. El promotor está subrayado, de verde están las regiones -35 y -10, en gris claro el inicio de la transcripción, en naranja el gen *duf* y en azul el gen *caescr11*, en café el inicio de otros genes que no pertenecen al operón, uno de ellos está en la hebra complementaria.

Se realizó una búsqueda de genes colindantes al operón *duf-caescr11* en las bases de datos, el resultado se presenta la Figura 6.25 donde puede verse que corriente arriba respecto a *duf* el gen colindante se encuentra en la otra hebra. El panel A es el resultado encontrado en la

base de datos de NCBI tomando como referencia el genoma completo de *G. thermoleovorans* KCTC; por su parte, en el panel B se muestra el resultado encontrado en la base de datos STRING, donde puede verse que, de acuerdo con los genomas curados y depositados en esa base de datos, la presencia del operón se encuentra en dos especies de *Geobacillus* y en ninguna otra especie cercana de *Bacillus*, lo que significa que el operón *duf-caescr11*, presente también en la cepa de estudio, tiene implicaciones presumiblemente de cooperación enzimática, que le confieren alguna forma de adaptación a estas especies.

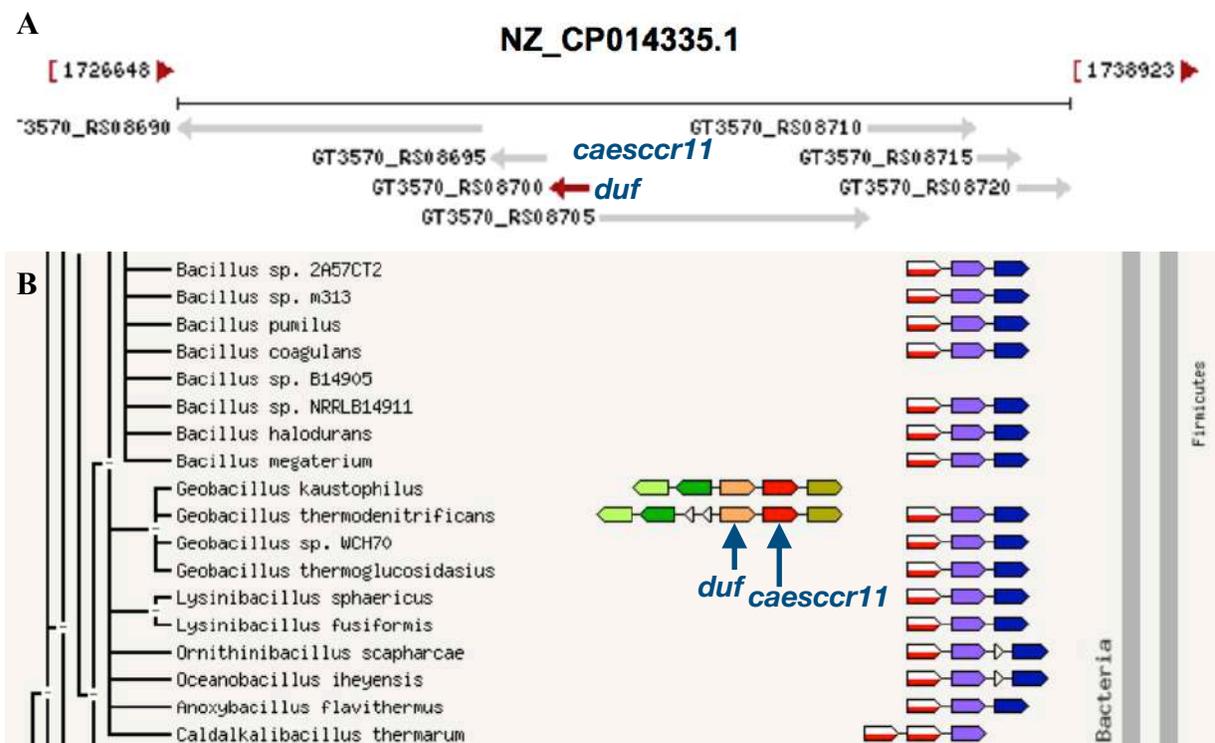


FIGURA 6.25 Ubicación del operón *duf-caescr11*. (A) En el genoma completo de *G. thermoleovorans* KCTC hallado en la base de datos de NCBI y (B) en la base de datos de STRING.

Con la secuencia aminoácidos de Duf se hizo la predicción de su estructura secundaria con dos servidores: Phyre2 (Kelley *et al.*, 2015) y DAS TM. (Cserzo *et al.*, 2002). El resultado

se muestra en la Figura 6.26 donde puede verse que Duf presenta regiones transmembrana además de un péptido señal.

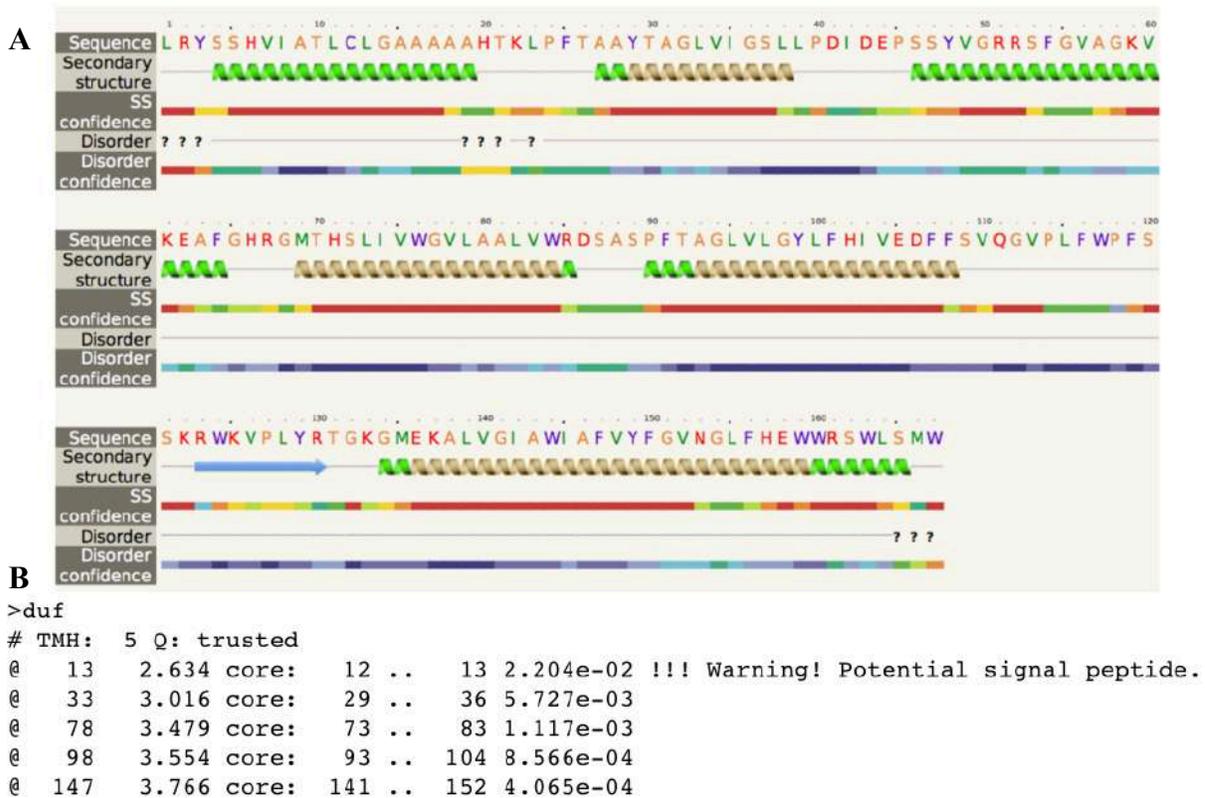


FIGURA 6.26 Predicción de la estructura secundaria de Duf a partir de la secuencia de aminoácidos. (A) Con el servidor Phyre2 donde las hélices doradas son regiones transmembrana y (B) Con el servidor DAS TM donde hace la predicción del péptido señal, que coincide con una hélice no señalada como de región transmembrana en la predicción de Phyre2.

Considerando que Duf y CaesCCR11 se expresan juntas por tener un solo promotor y presumiendo que por análisis de dominios en la secuencia, Duf tiene péptido señal y regiones transmembrana, resta suponer que la función biológica de CaesCCR11 tiene que ver quizá con la hidrólisis de lípidos que pueden ser tóxicos para la célula. Conley y Kabara publicaron en 1973 un estudio para determinar la concentración mínima inhibitoria de ésteres de ácidos grasos de glicerol contra organismos Gram (+) y Gram (-), y encontraron que éstos últimos no

se vieron afectados, sin embargo los primeros sí. El compuesto más activo por su toxicidad hacia la célula fue el monoacilglicerol laurato, contrario a los monoacilgliceroles acetato y butirato, y los di- y tri- gliceroles de laurato que no tuvieron actividad antimicrobiana.

Más tarde Kabara y colaboradores en 1978 proponen que el mecanismo de acción bactericida de los ácidos grasos de cadena larga y sus derivados se debe a un equilibrio entre las partes hidrofílicas e hidrofóbicas de la molécula tóxica. La porción hidrofóbica de la molécula es el componente más importante en la acción antimicrobiana. Otros derivados dodecanoicos estudiados como alcoholes, aldehídos, ácidos carboxílicos, amidas, aminas o aminimidas no presentaron actividad antimicrobiana. Independientemente de la polaridad de la porción hidrofílica, la longitud óptima de la cadena para el efecto antimicrobiano está entre C12 y C16. En la preparación de compuestos con actividad antimicrobiana, la cadena hidrofóbica corta es más efectiva en los grupos hidrofílicos neutros y ácidos, mientras que los compuestos catiónicos y dipolares tienen actividades óptimas en las cadenas más largas.

Una comparación de la hidrofobicidad de las proteínas Duf y CaesCCR11 se presenta en la Figura 6.27, ahí puede verse que Duf es más hidrofóbica que CaesCCR11 y esta característica le permite ser compatible con la hidrofobicidad de la membrana que es en donde está predicha su ubicación. Sin embargo, la hidrofobicidad de CaesCCR11 no es despreciable, como se vió anteriormente en las dificultades presentadas para su desagregación.

La hidrofobicidad de Duf está relacionada con la compatibilidad de su ubicación en la membrana, por su parte, la hidrofobicidad de CaesCCR11 está relacionada con su afinidad por su sustrato, esto sugiere la posibilidad de una cooperación entre ambas proteínas, pudiera ser que la función hasta ahora desconocida de Duf tenga que ver con la vinculación de la CaesCCR11 con su sustrato, quizá Duf forme una especie de túnel para dirigir el sustrato que está fuera de la célula hacia CaesCCR11, que está dentro de la célula; otra posibilidad sería que el sustrato difundiera al interior de la célula y entonces la función de Duf fuera la de guiar

a CaesCCR11 hacia una zona cercana a la membrana mediante una forma de interacción hidrofóbica entre ambas proteínas, desde el momento en que son expresadas en conjunto.

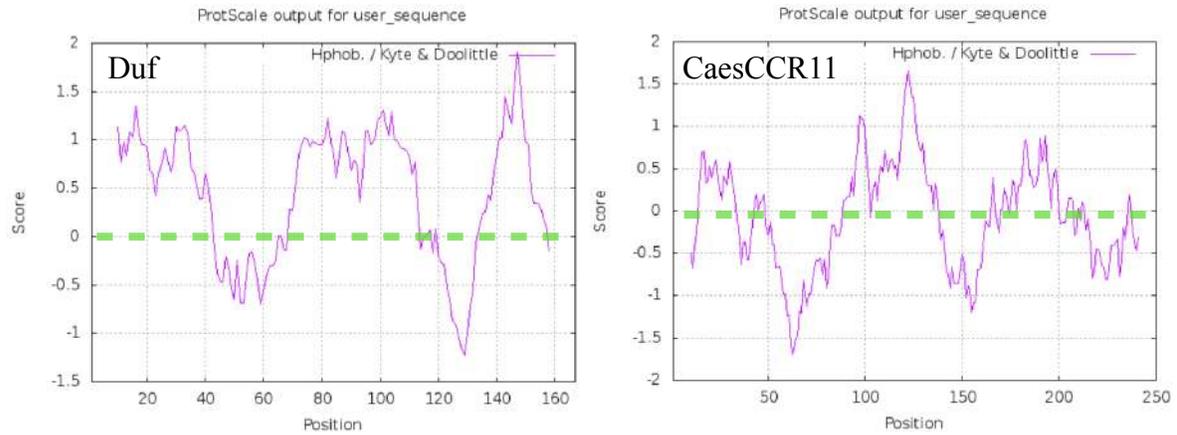


FIGURA 6.27 Comparación de la hidrofobicidad de Duf y CaesCCR11 basada en la escala de Kyte y Doolittle. (servidor ExPASy de Gasteiger *et al.*, 2005)

Por otra parte, también se hizo la modelación de la estructura terciaria de Duf, con y sin péptido señal, considerando la posibilidad de que éste fuera hidrolizado antes o después de su plegamiento. Dicha modelación se presenta en la Figura 6.29, donde puede apreciarse que el plegamiento que incluye el péptido señal (Panel A) posee seis hélices- $\alpha$ , y cuando Duf se pliega sin el péptido señal, las hélices- $\alpha$  se ensamblan en dos hélices- $\alpha$  más largas que las del modelo anterior mas dos hélices cortas. Ninguno de los dos modelos predichos posee plegamientos de hoja- $\beta$  y en ambos está presente una zona amplia de giros.

Puede apreciarse que la calidad de los modelos de DUF y sus parámetros (Tabla 6.12), no es muy alta, considerando que la proteína para el modelo A tiene 167 aminoácidos y para el modelo B tiene 149 aminoácidos.

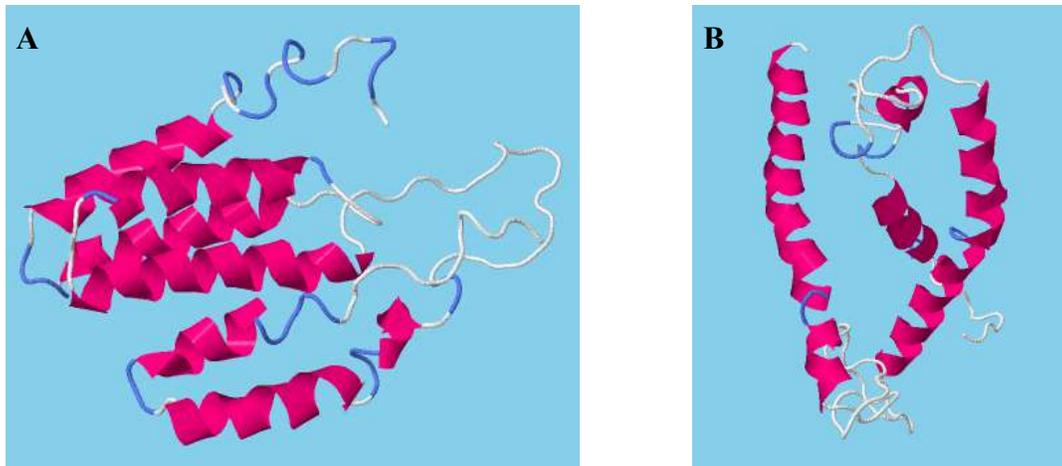


FIGURA 6.28 Predicción de la estructura terciaria para Duf por medio del servidor RaptorX. (A) Plegamiento sin el corte previo del péptido señal y (B) Plegamiento con el corte previo del péptido señal.

TABLA 6.12 Puntuaciones de calidad de los modelos obtenidos para Duf. A y B son lo mismo que en la Figura 6.28

Parámetro	A	B	Explicación
P-value	9.11E-04	9.35E-04	El número más pequeño es mejor.
uGDT(GDT)	51(31)	50(33)	Test de distancia global, sin normalizar y normalizado. Mayor a 50 es mejor.
uSeqId(SeqId)	10(6)	11(7)	Es el número de residuos idénticos, sin normalizar y normalizado.
Score	99	90	Es la puntuación de alineación que oscila entre 0 y la longitud de la secuencia, donde 0 indica lo peor.

El modelo A está basado en dos templados: 3RCE y 3WAJ. Ambos corresponden a una oligosacaril transferasa. El primer templado es una enzima de *Campilobacter lari*, reportada por Lizak *et al.* (2011), que tiene 732 aminoácidos y tamaño molecular de 85.3 kDa; el segundo es una enzima de *Archaeoglobus fulgidus*, reportada por Matsumoto *et al.* (2013), que

tiene 875 aminoácidos y tamaño molecular de 99.2 kDa. La oligosacaril transferasa transfiere una cadena de oligosacárido a los residuos de asparagina en las proteínas.

El modelo B está basado en el templado 2A65 que corresponde a una proteína transportadora dependiente de  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$  de *Aquifex aeolicus* (cepa VF5) reportada por Yamashita *et al.* (2005), que tiene 519 aminoácidos y tamaño molecular de 59.7 kDa. La coincidencia de residuos idénticos es escasa en ambos modelos, sin embargo debe resaltarse la relación hallada con un dominio de segmento transmembrana de proteína transportadora y el hecho de que la naturaleza y función de Duf permanece desconocida.

La presencia del operón *duf-caescr11* se verificó mediante la expresión de CaesCCR11 en condiciones nativas, de acuerdo con la metodología presentada en la sección 5.6.3. En la Figura 6.29 se muestra el gel de poliacrilamida en condiciones disociantes y el zimograma correspondiente a la expresión nativa de CaesCCR11 con choque térmico y con adición de Tritón X-100. Puede verse que CaesCCR11 se expresa en los tres tratamientos pero de forma diferenciada, en todos los casos aparece pegada en el paquete celular (carriles 3, 6 y 9) y sólo cuando se hace el choque térmico a 75 °C ésta se detecta en la fracción intracelular (carril 8).

En cuanto a las temperaturas, los tratamientos con choque térmico provocaron una expresión mayor de la enzima, pudiendo incluso observarse a la enzima en el interior celular (carril 8, panel B).

En el zimograma (Figura 6.29, panel B) puede verse la banda fluorescente un poco tenue en el carril 2 y progresivamente más intensa en los carriles 3, 9, 6 y 8 pero no en los carriles 1, 4 7, esto pone en evidencia que CaesCCR11 no es extracelular puesto que no se expresó en el sobrenadante de cualquier tratamiento.

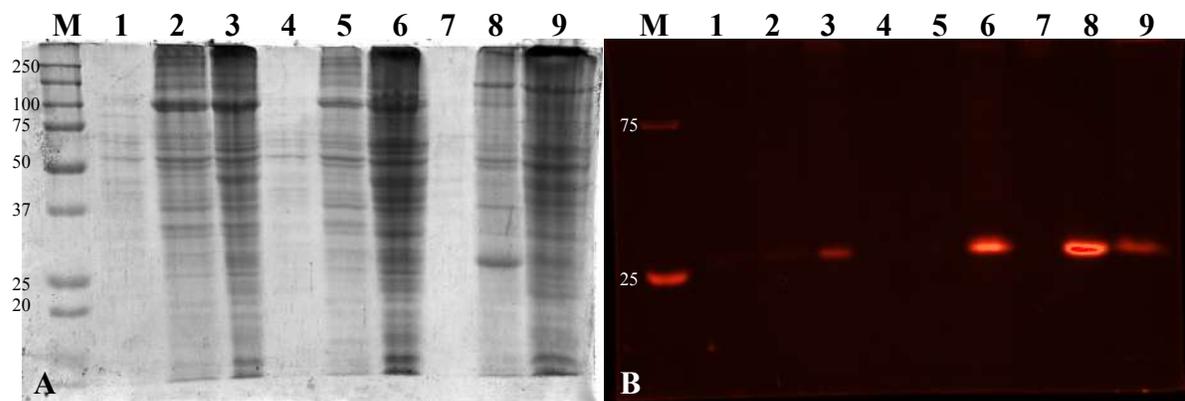


FIGURA 6.29 Electroforesis de gel de poliacrilamida al 12 % en condiciones disociantes de la expresión de CaesCCR11 en forma nativa, a 55 °C en medio de cultivo Schmidt-Dannert. Panel A: (M) Marcador 161-0377 de BioRad, (1) Fracción del sobrenadante del testigo, (2) Fracción intracelular del testigo, (3) Fracción pegada al paquete celular del testigo, (4) Fracción del sobrenadante con choque térmico a 65 °C, (5) Fracción intracelular con choque térmico a 65 °C, (6) Fracción pegada al paquete celular con choque térmico a 65 °C, (7) Fracción del sobrenadante con choque térmico a 75 °C, (8) Fracción intracelular con choque térmico a 75 °C, (9) Fracción pegada al paquete celular con choque térmico a 75 °C. Panel B Zimograma, mismos carriles que en A.

La proteína pegada a la membrana es aquella recuperada en los restos celulares después de la lisis por pulsos ultrasónicos, y la proteína intracelular es aquella recuperada en el sobrenadante después de la lisis por pulsos ultrasónicos. En este sentido puede apreciarse que a excepción del tratamiento del choque térmico a 75 °C, CaesCCR11 se encontró más en la fracción pegada que en la intracelular.

Para conocer la presencia de CaesCCR11 desde el ARN mensajero, se realizó la extracción señalada en la sección 3.6.3. Con la conversión del ARN en ADN complementario se hizo la PCR de acuerdo a la metodología de la sección 5.6.2.1. Puede verse la amplificación del testigo positivo (Carril +) en los paneles A (*duf-caes*), B (*caes*) y C (*duf*) (Figura 6.30) así como las amplificaciones en los paneles B y C en los carriles LB 75 a la misma altura correspondiente a cada testigo positivo.

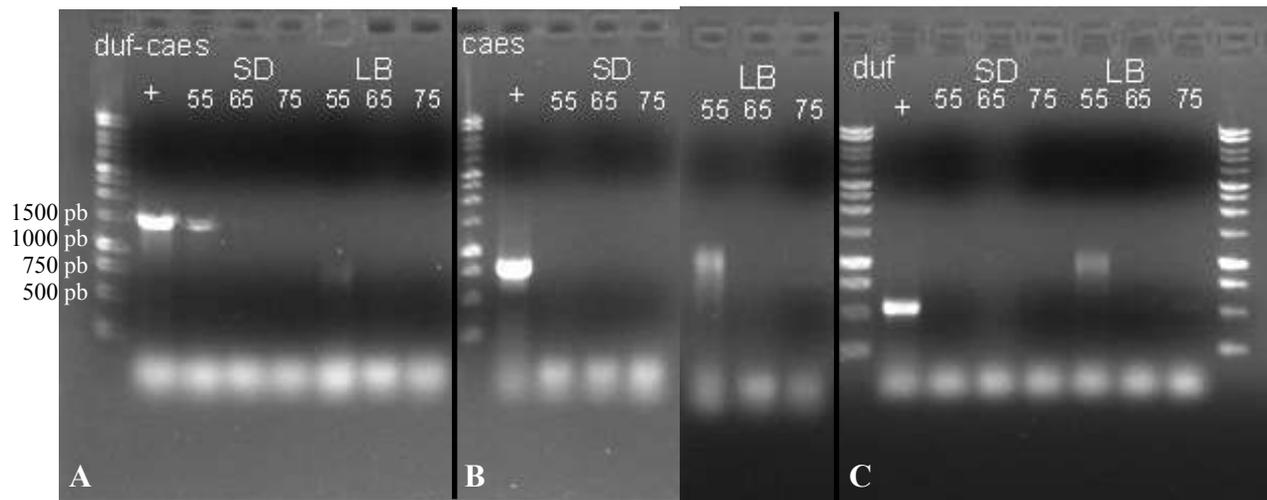


FIGURA 6.30 Electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1 % de los productos amplificados por PCR, a partir del ADN complementario de la expresión nativa de CaesCCR11. (A) Amplificación del operón *duf-caesccr11*, (B) Amplificación de *caesccr11* y (C) Amplificación de *duf*. Carriles: (+) testigo positivo con el ADN cromosómico de *G. thermoleovorans* CCR11; (55) testigo; (65) con choque térmico a 65 °C; (75) con choque térmico a 75 °C; (SD) proveniente del cultivo en medio Schmidt-Dannert a 55 °C y (LB) proveniente del cultivo en medio Luria Bertani a 55 °C.

Dichas amplificaciones pueden deberse a la inducción de la expresión por el choque térmico, que es una condición de estrés para la célula por la posible susceptibilidad de la membrana de *G. thermoleovorans* CCR11. En todo caso queda pendiente evaluar si la expresión de Duf y CaesCCR11 está sujeta también a la condición de estrés provocada por el Tritón X-100, ya que en este experimento la extracción del ARN ocurrió justo al término del choque térmico y el Tritón X-100 se agrega después, hacia las últimas 12 h de incubación.

Finalmente queda considerar el papel que desempeña el Tritón X-100 en el cultivo de la cepa nativa, por un lado la enzima se induce desde el medio de cultivo por la presencia del aceite y por otro el Tritón X-100 ha sido empleado en la lisis celular como solubilizador de las membranas. De acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo, con la precipitación térmica a 60 °C durante 30 min a pH cercano al punto isoeléctrico de CaesCCR11 y de otras contaminantes, y con la aparente formación de una película en el retenido de la ultrafiltración, pareciera que el detergente tiene una función lubricante entre las moléculas de proteína por afinidad con las partes hidrofóbicas, y que esta misma función lubricante es la que resulta de

intercalarse entre los elementos lipídicos estructurales de la membrana, reduciendo la tensión más que desagregando las moléculas por sus interacciones hidrofóbicas. Esto sin duda requerirá mayor investigación por venir.

## CONCLUSIONES

- I. La estrecha diferencia del punto isoeléctrico y peso molecular de la CaesCCR11 con las proteínas contaminantes no permitió que la ultrafiltración fuera un proceso de purificación adecuado.
- II. La purificación de la CaesCCR11 por electroforesis preparativa condujo a la obtención de suficiente proteína en concentración y pureza para hacer la cristalización.
- III. No fue posible obtener la estructura terciaria de la esterasa CaesCCR11 por difracción de rayos X, difracción de electrones o RMN, lo que sugiere un desorden de la proteína, o de su microambiente en solución, cuyo origen puede estar en la electroforesis preparativa y en la concentración centrífuga.
- IV. La CaesCCR11 mostró una alta tendencia a la formación de agregados, mismos que deben resolverse exitosamente, de manera previa y en modo compatible con el método de purificación elegido.
- V. De acuerdo con la estructura modelada *in silico*, CaesCCR11 posee seis hélices- $\alpha$  y siete hojas- $\beta$  del plegamiento canónico  $\alpha/\beta$  hidrolasa, un dominio de tapa de 44 residuos, un agujero oxianión (Phe 29 y Met 98) y ocho puentes de sal.
- VI. En el genoma de *Geobacillus thermoleovorans*, *Geobacillus kaustophilus* y *Geobacillus thermocatenulatus*, el gen de CaesCCR11 está presente como operón con un gen *duf*, y su expresión en conjunto sugiere una acción enzimática cooperativa.

## RECOMENDACIONES

- I. Obtener la enzima recombinante con firma de histidinas para mejorar el proceso de purificación.
- II. Seleccionar el mejor detergente que sea capaz de desagregar la enzima en las condiciones de pH y fuerza iónica compatibles con el procedimiento de elucidación de la estructura terciaria.
- III. Inducir la expresión de CaesCCR11 recombinante en un medio con sales enriquecidas para ser detectada durante el análisis de RMN. Preparar la proteína purificada en amortiguador de fosfatos 0.05 M a pH 6.5.
- IV. Medir la expresión de los genes de *duf* y *caes* en diferentes condiciones de temperatura y concentración de Tritón X-100.

## REFERENCIAS

- Amero, C. (2011) Aplicaciones de resonancia magnética nuclear en el estudio de proteínas Recuperado el 24 de marzo de 2015 del sitio web del Depto. de Bioquímica de la Fac. de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México [http://bq.unam.mx/wikidep/uploads/MensajeBioquimico/Mensaje\\_Bioq11v35p159-172\\_Amero.pdf](http://bq.unam.mx/wikidep/uploads/MensajeBioquimico/Mensaje_Bioq11v35p159-172_Amero.pdf)
- Angkawidjaja, C., Koga, Y., Takano, K. y S. Kanaya. (2012) Structure and stability of a thermostable carboxylesterase from the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus tokodaii*. The FEBS Journal 279: 3071-3084
- Arpigny, J. L. y K. E. Jaeger. (1999) Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. Journal of Biochemistry 343: 177-183
- Arunkumar, A. y M. R. Etzel. (2013) Fractionation of  $\alpha$ -lactalbumin from  $\beta$ -lactoglobulin using positively charged tangential flow ultrafiltration membranes. Separation and Purification Technology 105: 121-128
- Atomi, H. y T. Imanaka. (2004) Thermostable carboxylesterases from hyperthermophiles. Tetrahedron: Asymmetry 15:2729-273
- Bendersky, L. A. y F. W. Gayle. (2001) Electron diffraction using transmission electron microscopy. Journal of Research of the National Institute of Standards and Technology 106: 997-1012
- Bornscheuer, U. T. (2002) Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. FEMS Microbiology Reviews 26, 73-81.
- Bradford, M. M. (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. Analytical Biochemistry 72, 248-254
- Byun, J. S., Rhee, J. K., Kim, N. D., Yoon, J. H., Kim, D. U., Koh, E., Oh, J. W. y H. S. Cho. (2007) Crystal structure of hyperthermophilic esterase EstE1 and the relationship between its dimerization and thermostability properties. BMC Structural Biology 7:47 doi: 10.1186/1472-6807-7-47
- Castro-Ochoa L. D., Rodríguez-Gómez, C., Valerio-Alfaro, G. y R. Oliart Ros. (2005) Screening, purification and characterization of the thermoalkalophilic lipase produced by *Bacillus thermoleovorans* CCR11. Enzyme and Microbial Technology 37: 648-654.

Charbonneau, D. M., Meddeb-Mouelhi, F. y M. Beauregard. (2010) A novel thermostable carboxylesterase from *Geobacillus thermodenitrificans*: evidence for a new carboxylesterase family. *Journal of Biochemistry* 148 (3): 299-308

Charbonneau, D. M. y M. Beauregard. (2013) Role of key salt bridges in thermostability of *G. thermodenitrificans* EstGtA2: distinctive patterns within the new bacterial lipolytic enzyme family XV. *PLOS ONE* 8(10):e76675 doi:10.1371/journal.pone.0076675

Chernov, A. A. (2003) Protein crystals and their growth. *Journal of Structural Biology*. 142:3-21

Conley A. J. y J. J. Kabara. (1973) Antimicrobial Action of Esters of Polyhydric Alcohols. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 4(5):501-506

Cserzo, M., Eisenhaber, F., Eisenhaber, B. e I. Simon. (2004) TM or not TM: transmembrane protein prediction with low false positive rate using DAS-TMfilter. *Bioinformatics* 20(1): 136-137

De Simone, G., Menchise, V., Manco, G., Mandrich, L., Sorrentino, N., Lang, D., Rossi, M. y C. Pedone. (2001) The cristal structure of a hyper-thermophilic carboxilesterase from the archeon *Archaeoglobus fulgidus*. *Journal of Molecular Biology* 314: 507-518

De Simone, G., Menchise, V., Alterio, V., Mandrich, L., Rossi, M., Manco, G. y C. Pedone. (2004) The cristal structure of an EST2 mutant unveils structural insights on the H group of the carboxilesterase/lipase family. *Journal of Molecular Biology* 343: 137-146

del Río Portilla, J. F. (2003) Determinación de la estructura de proteínas por resonancia magnética nuclear. Recuperado el 30 de diciembre de 2013 del sitio web del Depto. de Bioquímica de la Fac. de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México [http://bq.unam.mx/wikidep/uploads/MensajeBioquimico/Mensaje\\_Bioq03v27p065\\_RioPortilla.pdf](http://bq.unam.mx/wikidep/uploads/MensajeBioquimico/Mensaje_Bioq03v27p065_RioPortilla.pdf)

Dünhaupt, A., Lang, S. y F. Wagner. (1992) *Pseudomonas cepacia* lipase: studies on aggregation, purification and on the cleavage of olive oil. *Biotechnology letters* 14(10): 953-958

Espinosa Luna, Graciela. (2013) Caracterización de una enzima con actividad éster hidrolasa de *Geobacillus thermoleovorans* CCR11. Tesis de Maestría en Ciencias. Instituto Tecnológico de Veracruz.

Espinosa-Luna, G., Sanchez-Otero, M.G., Quintana-Castro, R., Matus-Toledo, R.E., Oliart-Ros, R. M. (2016) Gene Cloning and Characterization of the *Geobacillus thermoleovorans*

CCR11 carboxylesterase CaesCCR11, a new member of family XV. *Molecular Biotechnology* 58: 37-46.

Ewis, H. E., Abdelal, A. T. y C. D. Lu. (2004) Molecular cloning and characterization of two thermostable carboxyl esterases from *Geobacillus stearothermophilus*. *Gene* 329:187–195

Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M.R., Appel, R.D. y A. Bairoch. (2005) Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In *The Proteomics Protocols Handbook*, J.M. Walker, ed. (Humana Press), pp. 571–607.

Hadidi, M. y A. L. Zidney (2014) Fouling behavior of zwitterionic membranes: Impact of electrostatic and hydrophobic interactions. *Journal of Membrane Science* 452: 97-103

Hasan F., Shah, A. A. y A. Hameed. (2006) Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme Microbial Technology* 39: 235-251

Hernández Campos F. J., Hernández Díaz W. N., Torrestiana Sanchez B., Pérez Orozco J. P., Arau Roffiel L. A. y A. Alvarez Castillo. (2012) Modificación de las propiedades de superficie en membranas de polietersulfona empleando radiación ultravioleta y su efecto en la purificación de IgY por ultrafiltración. *Revista Iberoamericana de Polímeros* 13(4), 158-168

Heinkel, F., Shen, L., Richard-Greenblatt, M., Okon, M., Bui, J. M., Gee, C. L., Gay, L. M., Alber, T., Av-Gay, Y., Gsponer, J. y L. P. McIntosh. (2018) Biophysical Characterization of the Tandem FHA Domain Regulatory Module from the Mycobacterium tuberculosis ABC Transporter Rv1747. *Structure*. <https://doi.org/10.1016/j.str.2018.04.018>

Hotta, Y., Ezaki, S., Atomi, H. y T. Imanaka. (2002) Extremely stable and versatile carboxylesterase from a hyperthermophilic archaeon. *Applied Environmental Microbiology* 68:3925–3931

Imamura S. y S. Kitaura (2000) Purification and characterization of a monoacylglycerol lipase from the moderately thermophilic *Bacillus sp.* H-257. *Journal of Biochemistry* 127: 419-425

Ishida, T. y K. Kinoshita (2007) PrDOS: prediction of disordered protein regions from amino acid sequence, *Nucleic Acids Research*, 35, Web Server issue.

Jena Biosciences JBS Kit de iniciación a la cristalización de proteínas [en línea] 2015 [fecha de consulta: 24 de junio de 2018]. Disponible en <<http://www.jenabioscience.com/images/0f4b2c43de/CS-401ES.pdf>>

Kabara J.J., Vrable, R. y M. S. F. Lie Kien Jie. (1978) Antimicrobial Lipids Natural and Synthetic Fatty Acids and Monoglycerides. *Lipids* 12(9): 753-759

- Källberg, M., Wang, H., Wang, S., Peng, J., Wang, Z., Lu, H. y J. Xu. (2012) Template-based protein structure modeling using the RaptorX web server. *Nature Protocols* 7, 1511–1522
- Kawasaki K., Kondo H., Suzuki M., Ohgiyaa S. y S. Tsudaa. (2002) Alternate conformations observed in catalytic serine of *Bacillus subtilis* lipase determined at 1.3 Å resolution. *Acta Crystallographica D* 58, 1168-1174
- Kelley, L. A., Mezeliuss, S., Yates, C. M., Wass, M. N. y M. J. E. Sternberg (2015) The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature Protocols* 10:845-858
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685
- Lesuisse, E., Schanck, K. y C. Colson. (1993) Purification and preliminary characterization of the extracellular lipase of *Bacillus subtilis* 168, an extremely basic pH-tolerant enzyme. *European Journal of Biochemistry* 216:155-160
- Liu, P., Wang, Y. F., Ewis, H. E., Abdelal, A. T., Lu, C. D., Harrison, R. W. e I. T. Weber. (2004) Covalent reaction intermediate revealed in crystal structure of the *Geobacillus stearothermophilus* carboxylesterase Est30. *Journal of Molecular Biology* 342: 551-561
- Liu, P., Ewis, H. E., Tai, P. C., Lu, C. D. e I. T. Weber. (2007) Crystal structure of the *Geobacillus stearothermophilus* carboxylesterase Est55 and its activation of prodrug CPT-11. *Journal of Molecular Biology* 367: 212-223
- Lizak, C., Gerber, S., Numao, S., Aebi, M. y K. P. Locher. (2011) X-ray structure of a bacterial oligosaccharyltransferase. *Nature*. 474:350–355.
- Manco, G., Giosue, E., D’Auria, S., Herman, P., Carrea, G. y M. Rossi. (2000) Cloning, Overexpression, and Properties of a New Thermophilic and Thermostable Esterase with Sequence Similarity to Hormone-Sensitive Lipase Subfamily from the Archaeon *Archaeoglobus fulgidus*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 373(1):182–192
- Margiolaki, I. y J. P. Wright (2007) Powder crystallography on macromolecules. *Acta Crystallographica A* 64, 169–180
- Matsumoto, S., Shimada, A., Nyirenda, J., Igura, M., Kawano, Y. y D. Kohda. (2013) Crystal structures of an archaeal oligosaccharyltransferase provide insights into the catalytic cycle of N-linked protein glycosylation. *Nature* 110(44):17868-17873.

- Montoro García, S., Martínez-Martínez, I., Navarro-Fernández, J., Takami, H., García-Carmona, F. y A. Sánchez-Ferrer (2009) Characterization of a Novel Thermostable Carboxylesterase from *Geobacillus kaustophilus* HTA426 Shows the Existence of a New Carboxylesterase Family. *Journal of Bacteriology* 191(9):3076–3085
- Morozkina, E. V., Slutszkaya, E. S., Fedorova, T. V., Tugay, T. I., Golubeva, L. I. y O. Koroleva. (2010) Extremophilic microorganisms: Biochemical adaptation and biotechnological application (Review). *Applied Biochemistry and Microbiology* 46 (1): 1-14
- Nawani N., Dosanjh, S. y J. Jaur. (1998) A novel thermostable lipase from a thermophilic *Bacillus sp*: characterization and esterification studies. *Biotechnology Letters* 20 (10): 997-1000
- Ollis, D.L., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolow, F., Franken, S.M., Harel, M., Remington, S.J., Silman, I., Shrag, J., Sussman, J.L., Verschueren, K.H.G. and A. Goldman. (1992) The  $\alpha/\beta$  hydrolase fold. *Protein Engineering*, 5(3):197–211
- Oswald, R., Pietzsch, M. y J. Ulrich. (2017) A view inside the nature of protein crystals. *Journal of Crystal Growth*, 469:176-179
- Palm, G. J., Fernández-Álvaro, P., Bogdanovic, X., Bartsch, S., Sczodrok, J., Singh, R. K., Böttcher, D., Atomi, H., Bornscheuer U. T. y W. Hinrichs. (2011) The crystal structure of an esterase from the hyperthermophilic microorganism *Pyrobaculum calidifontis* VA1 explains its enantioselectivity. *Applied Microbiology Biotechnology* 91: 1061-1072
- Pouderoyen, G. V., Eggert, T., Jaeger, K-E., y B. W. Dijkstra. (2001) The Crystal Structure of *Bacillus subtilis* Lipase: A Minimal  $\alpha/\beta$  Hydrolase Fold Enzyme. *Journal of Molecular Biology*, 309(1), 215-226. DOI: 10.1006/jmbi.2001.4659
- Prim, N., Sánchez, C., Ruiz, F. I., Pastor, J. and P. Díaz. (2003) Use of methylumbelliferyl-derivative substrates for lipase activity characterization. *Journal of Molecular Catalysis. B: Enzymatic* 22:339-346
- Qian, Y. Q., Billeter, M., Otting, G., Müller, M., Gehring, W. J. y K. Wüthrich. (1989) The Structure of the *Antennapedia* Homeodomain Determined by NMR Spectroscopy in Solution: Comparison with Prokaryotic Repressors. *Cell* 59:573-580
- Quintana-Castro R., Díaz, P., Valerio-Alfaro, G., García, H. S. y R. Oliart-Ros. (2008) Gene cloning, expression and characterization of the *Geobacillus thermoleovorans* CCR11 thermoalkaliphilic lipase. *Molecular Biotechnology* doi: 10.1007/s12033-008-9136-6.

Rangel-Pereira, M., Carvalho-Maester, T., Mercaldi, G. F., de Macedo-Lemos, E. G., Hyvönen, M. y A. Balan. (2017) From a metagenomic source to a high-resolution structure of a novel alkaline esterase. *Applied Microbiology Biotechnology*. 101, 4935– 4949 DOI: 10.1007/s00253-017-8226-4

Rao S. y A.L. Zydney. (2006) High resolution protein separations using affinity ultrafiltration with small charged ligands. *Journal of Membrane Science* 280:781–789

Reese, M.G. (2001) Application of a time-delay neural network to promoter annotation in the *Drosophila melanogaster* genome. *Computational Chemistry* 26(1):51-6

Rengachari, S., Bezerra, G. A., Riegler-Berket, L., Gruber, C.C., Sturm, C., Taschler, U., Boeszoermy, A., Dreveny, I., Zimmermann, R., Gruber K. y M. Oberer. (2012) The structure of monoacylglycerol lipase from *Bacillus sp.* H-257 reveals unexpected conservation of the cap architecture between bacterial and human enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1821: 1012-1021

Rengachari, S., Aschauer, P., Schittmayer, M., Mayer, N., Gruber, K., Breinbauer, R., Birner-Gruenberger, R., Dreveny, I. y M. Oberer. (2013) Conformational plasticity and ligand binding of bacterial monoacylglycerol lipase. *The Journal of Biological Chemistry*. 288 (43): 31093-31104

Rhee, J. K., Ahn, D. G., Kim, Y. G. y J. W. Oh (2005) New Thermophilic and Thermostable Esterase with Sequence Similarity to the Hormone-Sensitive Lipase Family, Cloned from a Metagenomic Library. *Applied and environmental microbiology* 71(2): 817-825

Rodríguez Gómez, Citlali. (2002) Aislamiento y caracterización parcial de bacterias termófilas de aguas termales y su posible aplicación en la biodesulfuración y recuperación mejorada del petróleo. Tesis de Maestría en Ciencias el Ingeniería Bioquímica. Instituto Tecnológico de Veracruz.

Rúa, M. L., Schmidt-Dannert, C., Wahl, S., Sprauer, A. y R. D. Schmid. (1997) Thermoalkalophilic lipase of *Bacillus thermocatenuatus* large-scale production, purification and properties: aggregation behavior and its effect on activity. *Journal of Biotechnology* 56: 89-102

Saksena, S. y A. L. Zidney. (1994) Effect of solution pH and ionic strength on the separation of albumin from immunoglobulins (IGG) by selective filtration. *Biotechnology and Bioengineering* 43:960-968

Sánchez Otero, María Guadalupe. (2011) Purificación y cristalización de las lipasas termoalcalófilas producidas por *Geobacillus thermoleovorans* CCR11. Tesis de Doctorado en Ciencias. Instituto Tecnológico de Veracruz.

Sánchez-Otero M. G., Quintana-Castro, R., Mora-González, P. C., Márquez-Molina, O., Valerio-Alfaro, G., y R. Oliart-Ros. (2010) Enzymatic reactions and synthesis of n-butyl caproate: esterification, transesterification and aminolysis using a recombinant lipase from *Geobacillus thermoleovorans* CCR11. *Environmental technology* 31 (10): 1101-1106

Sayer, C., Isupov, M. N., Bonch-Osmolovskaya, E. y J. A. Littlechild. (2015) *FEBS Journal*. 282:2846-2857

Schiraldi, C. y M. De Rosa (2002) The production of biocatalysts and biomolecules from extremophiles. *Trends in Biotechnology* 20 (12): 515-521

Schlieben, N. H., Niefind, K. y D. Schomburg. (2004) Expression, purification and aggregation studies of His-tagged thermoalkalophilic lipase from *Bacillus thermocatenolatus*. *Protein Expression and Purification* 34(1):103-110

Scmidt-Dannert, C., Rúa, L., Atomi, H. y R. Schmid. (1996) Thermoalkalophilic lipase of *Bacillus thermocatenulatus*. I. Molecular cloning, nucleotide sequence, purification and some properties. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1301, 105-114

Shi, D., Nannenga, B. L., Iadanza M. G. y T. Gonen. (2013) Three-dimensional electron crystallography of protein microcrystals. *eLife* 2:e01345 doi: 10.7554/eLife.01345

Shiraki, K., Motonori, K., Fujiwara, S., Imanaka, T. y M. Takagi. (2002) Biophysical effect of amino acids on the prevention of protein aggregation. *Journal of Biochemistry* 132:591-595

Solovyev, V. y A. Salamov (2011) Automatic Annotation of Microbial Genomes and Metagenomic Sequences. In *Metagenomics and its Applications in Agriculture, Biomedicine and Environmental Studies* (Ed. R.W. Li), Nova Science Publishers, p. 61-78

Song, J., Lee, M. S., Carlberg, I., Vener, A. V. y J. L. Markley. (2006) Micelle-Induced Folding of Spinach Thylakoid Soluble Phosphoprotein of 9 kDa and Its Functional Implications. *Biochemistry* 45(51):15633-15643

Stevenson H. P., Makhova A. M., Calero M., Edwards A. L., Zeldin O.B., Mathews I.I., Lin G., Barnes C. O., Santamaria H., Ross T. M., Soltis S. M., Khosla C, Nagarajan V., Conway J. F., Cohen A. E. y G. Calero. (2014) Use of transmission electron microscopy to identify nanocrystals of challenging protein targets. *PNAS* 111(23):8470-8475

Studholme D. J. (2014) Some (bacilli) like it hot: genomics of *Geobacillus* species. *Microbial Biotechnology* 8:40–48

Velu, N., Divakar, K., Nandhinidevi, G. y P. Gautam. (2012) Lipase from *Aeromonas caviae* AU04: Isolation, purification and protein aggregation. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 1:45–50

Wan, Q., Bennett, B. C., Wilson, M. A., Kovalevsky, A., Langan, P., Howell, E. E. y C. Dealwis. Towards resolving the catalytic mechanism of dihydrofolate reductase using neutron and ultrahigh resolution X-ray crystallography. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 111, 51 (2014): 18225-18230.

Wishart, D. S., Sykes, B. D. y F. M. Richards. (1992) The Chemical Shift Index: A Fast and Simple Method for the Assignment of Protein Secondary Structure through NMR Spectroscopy. *Biochemistry* 31:1647-1651

Yamashita, A., Singh, S. K., Kawate, T., Jin, Y. y E. Gouaux (2005) Crystal structure of a bacterial homologue of Na(+)/Cl(-)-dependent neurotransmitter transporters. *Nature* 437:215-223

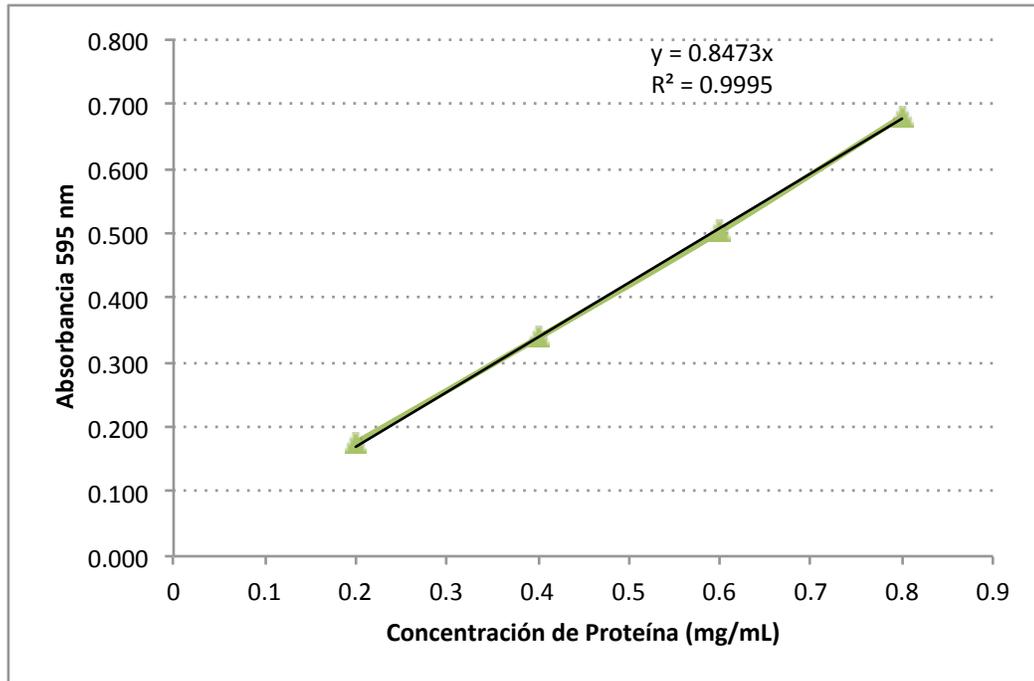
Yun, H., Lee, J.W., Jeong, J., Chung, J., Park, J.M., Myoung, H.N. y S. Y. Lee (2007) EcoProDB: the Escherichia coli protein database. *Bioinformatics*. 23 (18): 2501-2503. 10.1093/bioinformatics/btm351.

Zeigler, D. R. (2014) The *Geobacillus* paradox: why is a thermophilic bacterial genus so prevalent on a mesophilic planet? *Microbiology* 160, 1–11

## APÉNDICE A

Curva estándar de albúmina de suero bovina

Para determinación de proteína por el método de Bradford



## APÉNDICE B

### Mini geles analíticos de poliacrilamida (condiciones disociantes).

El sistema de amortiguadores de Laemmli requiere la preparación de soluciones stock que luego son mezcladas, en distintas proporciones, para fraguar los geles de separación y de empaquetamiento.

#### Soluciones Stock

##### A. Acrilamida/Bis (30 % T, 2.67 % C)

146 g acrilamida (29.2 g/100 mL)

4 g N<sup>7</sup>N<sup>7</sup>-Bis-metilen-acrilamida (0.8 g/100 mL)

Aforar a 500 mL con agua destilada. Filtrar y almacenar a 4°C protegido de la luz, 30 días a lo máximo.

##### B. Tris-HCl 1.5 M pH 8.8

54.45 g Tris base o Trizma base (18.15 g/100 mL)

Aproximadamente 150 mL de agua destilada

Ajustar el pH a 8.8 con HCl 1 N, aforar a 300 mL con agua destilada y almacenar a 4°C.

##### C. Tris-HCl 0.5 M pH 6.8

6 g Tris base

Aproximadamente 60 mL de agua destilada

Ajustar el pH a 6.8 con HCl 1 N, aforar a 100 mL con agua destilada y almacenar a 4°C.

##### D. SDS 10%

Disolver 10 g de SDS en agua destilada agitando suavemente y llevar a 100 mL con agua destilada. Almacenar a temperatura ambiente.

#### E. Amortiguador de la muestra.

Agua destilada	3.8 mL
Tris-HCl 0.5 M pH 6.8	1.0 mL
Glicerol	0.8 mL
SDS 10% (p/v)	1.6 mL
2 $\beta$ -mercaptoetanol	0.4 mL
Azul bromofenol 0.05% (p/v)	0.4 mL
Total	8.0 mL

El amortiguador reductor se almacena a temperatura ambiente. Diluir la muestra al menos 1:4 con el amortiguador y calentar a 95°C por 4 minutos.

#### F. Amortiguador de corrida 5x, pH 8.3.

Tris base	45 g	(15 g/L)
Glicina	216 g	(72 g/L)
SDS	15 g	(5 g/L)

Aforar a 3 L con agua destilada. Almacenar a 4°C, entibiar a 37°C antes de usarlo en caso de precipitación. Diluir 300 mL de solución stock 5x con 1200 mL de agua destilada para una corrida de electroforesis. No ajustar el pH con ácido o base.

Preparación del gel de resolución al 12 % en condiciones disociantes. (Tris 0.375 M concentración final, pH 8.8)

Agua destilada	33.45 mL
Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8	25.0 mL
SDS 10% (p/v)	1.0 mL
Acrilamida/Bis (30 %)	40 mL
Sol. Persulfato de amonio 10% (p/v)	500 $\mu$ L
TEMED	50 $\mu$ L
Total	100 mL

La solución de persulfato de amonio (APS) se prepara al momento disolviendo 100 mg de APS en 1 mL de agua destilada.

Reducir las cantidades al volumen deseado usando la regla de tres. Se requieren 10 mL aproximadamente para fraguar dos mini geles de resolución de 0.75 o 1.0 mm de grosor.

Después de fraguar el gel de resolución, se coloca una pequeña cantidad de butanol saturado con agua para dejar una línea fina sin imperfecciones. Este butanol se retira con un papel filtro una vez que el gel se ha fraguado (aproximadamente 20 min). La línea del gel de resolución está 5 mm por debajo de la parte inferior del peine.

Preparación del gel de empacamiento al 4% en condiciones disociantes. (Tris 0.125 M concentración final, pH 6.8)

Agua destilada	6.04 mL
Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8	2.5 mL
SDS 10% (p/v)	100 $\mu$ L
Acrilamida/Bis (30 %)	1.3 mL
Sol. Persulfato de amonio 10%	50 $\mu$ L
TEMED	10 $\mu$ L
Total	10 mL

Reducir las cantidades al volumen deseado usando la regla de tres. Se requieren 2.5 mL aproximadamente para fraguar dos mini geles de empacamiento de 0.75 o 1.0 mm de grosor. Colocar el peine para formar los pozos y cuidadosamente vaciar el gel de empacamiento vigilando que no se formen burbujas.

Corrida de los geles

Los minigeles de poliacrilamida de 0.75 o 1.0 mm de grosor pueden correrse a 13, 15 o 18 mA constantes dependiendo del número de geles que se pongan a correr al mismo tiempo en la

misma cámara de electroforesis. El reuso del amortiguador de corrida, determina que el proceso pueda durar de 1.5 a 2 h o más.

Teñido de los geles con Azul de Coomasie

a. Solución de Teñido

Ácido acético glacial 10 % (v/v)

Metanol 40 % (v/v)

Agua destilada 50 % (v/v)

Coomasie Blue R-250 0.1 % (p/v) disuelto previamente en el agua.

Teñir durante media hora en agitación orbital u oscilante.

b. Solución de desteñido

Ácido acético glacial 10 % (v/v)

Metanol 40 % (v/v)

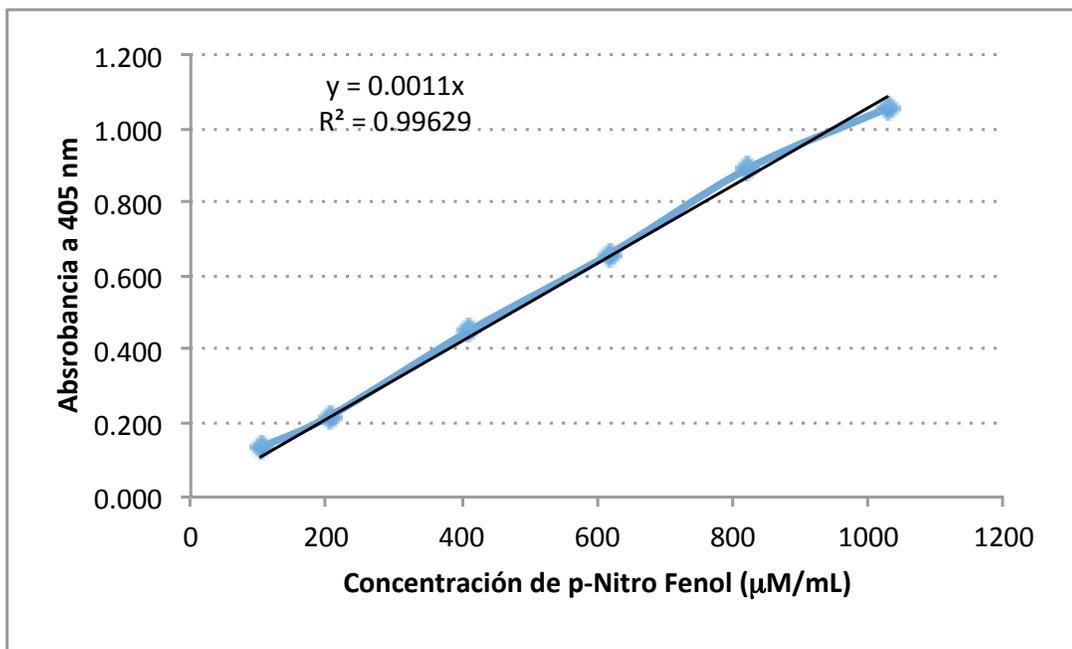
Agua destilada 50 % (v/v)

Desteñir en agitación orbital u oscilante, colocar unos trozos de papel absorbente para atrapar el colorante, vigilar la definición de las bandas.

Otra opción de desteñido es usar solamente agua destilada tibia con el papel absorbente, en agitación.

## APÉNDICE C

Curva estándar de *p*-nitro fenol para determinación del coeficiente de extinción molar  
En las condiciones de ensayo



## APÉNDICE D

### Electroforesis preparativa

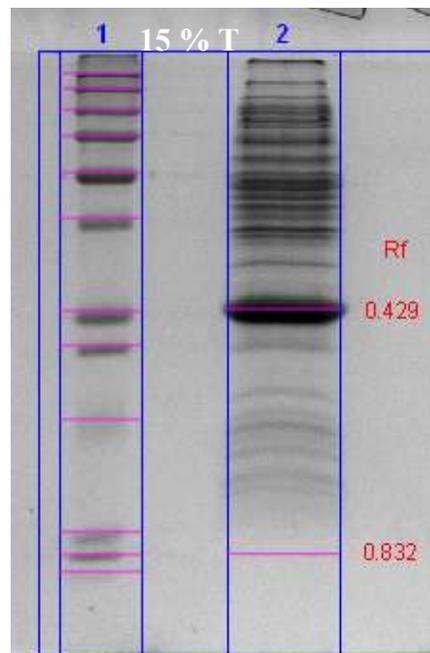
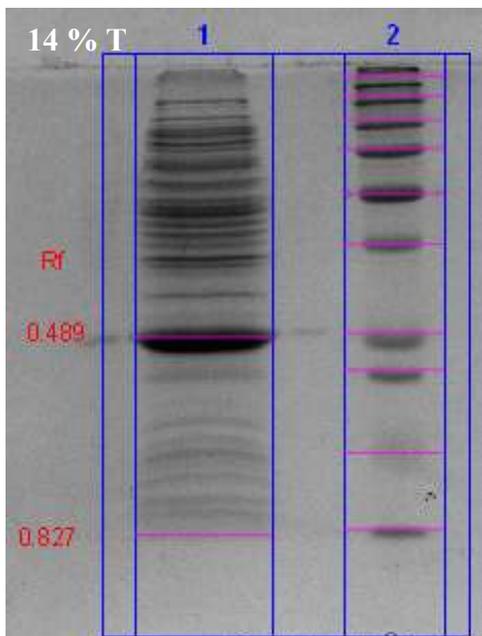
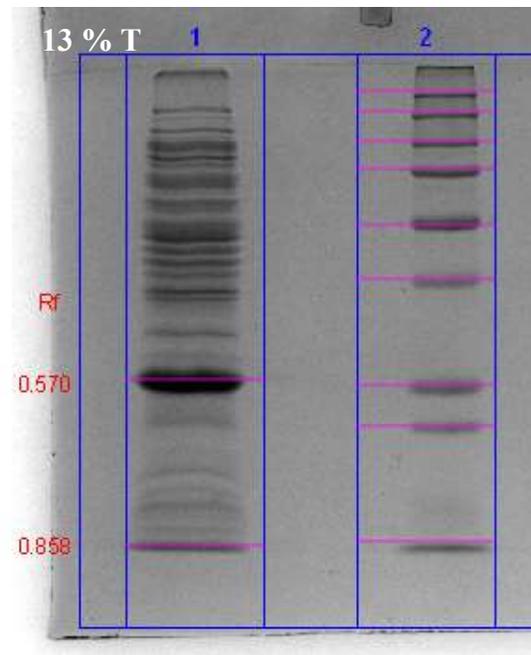
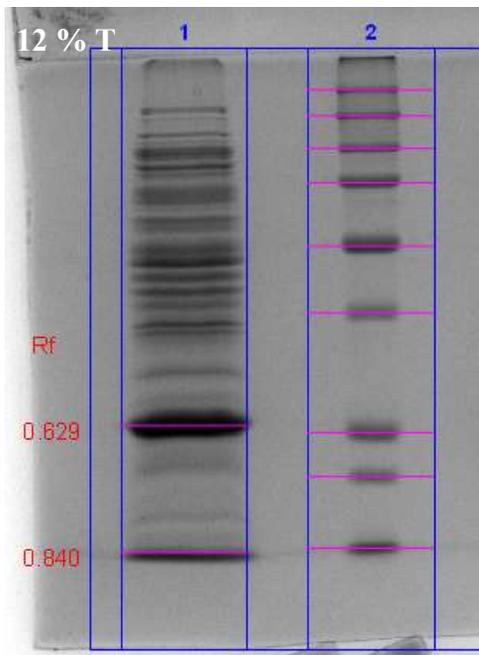
El equipo usado fue el Model 491 Prep Cell, éste tiene dos tubos para fraguar y correr el gel, de 28 y 37 mm de diámetro interior, el área superficial para ambos geles es de 3.6 y 8.2 cm<sup>2</sup> respectivamente, la altura puede ser hasta de 10 cm máximo para cada tubo, misma que contribuirá a la resolución necesaria para la separación de la proteína de interés. Las proteínas viajan a lo largo del gel y son colectadas la parte baja en una cámara mediante arrastre con el amortiguador de elución hacia el colector de fracciones.

Optimización de la electroforesis preparativa.

Las tres variables que se van a seleccionar son: tamaño del poro del gel de resolución (porcentaje de acrilamida), longitud y diámetro del gel tubular. El cálculo de los valores para estas variables depende de la distancia de la proteína contaminante más cercana a la proteína de interés. Para esto se corren cuatro o cinco mini geles de poliacrilamida en condiciones disociantes con distintas concentraciones de acrilamida.

La solución stock de acrilamida se prepara al 30 % (p/v) de T, que es la suma en peso del monómero (acrilamida) más el entrecruzador (bis). De la solución stock se hacen los cálculos para fraguar los mini geles desde el 10 hasta el 15 % de T dependiendo del tamaño de la proteína de interés. Un alto porcentaje de T resuelve mejor las proteínas pequeñas, un bajo porcentaje de T resuelve mejor las proteínas grandes.

Los geles se corren con el extracto crudo o semi purificado para identificar la distancia entre la proteína de interés y la contaminante más cercana. También se hace el cálculo de la movilidad relativa (Rf) que es el cociente entre la distancia que migró la proteína de interés y la distancia a la que migró el frente.



El software ImageLab de BioRad hace el cálculo de un valor de Rf que se presenta de color rojo en los geles, el cociente se determinó entre esos dos valores de Rf para cada gel. El valor del cociente está entre paréntesis: gel al 12 % T (0.75), 13 % T (0.66), 14 % T (0.59) y 15 % T (0.52). De acuerdo con la recomendación del fabricante, el valor apropiado del cociente debe

estar ente 0.55 y 0.60, de ahí que se haya seleccionado el valor de 14.5 como el porcentaje de la acrilamida en el gel de resolución. El gel de empacamiento siempre es al 4 %. Por otra parte, dada la estrecha cercanía entre los pesos moleculares de la proteína de interés y otras contaminantes, se eligió el tubo de 37 mm de diámetro y la longitud de 10 cm, que son las condiciones de máxima capacidad para el Prep Cell, para lograr la más alta resolución.

#### Soluciones Stock

##### A. Acrilamida/Bis (30 % T, 2.67 % C)

146 g acrilamida (29.2 g/100 mL)

4 g N'N'-Bis-metilen-acrilamida (0.8 g/100 mL)

Aforar a 500 mL con agua destilada. Filtrar y almacenar a 4°C protegido de la luz, 30 días a lo máximo.

##### B. Tris-HCl 1.5 M pH 8.8

54.45 g Tris base o Trizma base (18.15 g/100 mL)

Aproximadamente 150 mL de agua destilada

Ajustar el pH a 8.8 con HCl 1 N, aforar a 300 mL con agua destilada y almacenar a 4°C.

##### C. Tris-HCl 0.5 M pH 6.8

6 g Tris base

Aproximadamente 60 mL de agua destilada

Ajustar el pH a 6.8 con HCl 1 N, aforar a 100 mL con agua destilada y almacenar a 4°C.

D. Amortiguador de corrida 10x

30 g Tris base

144 g Glicina

10 g SDS

Disolver y aforar a 1 L. No ajustar el pH con ácido o base.

E. Amortiguador de elución de la proteína 10x

Tris HCl 0.1 M pH 7.5

Los amortiguadores de elución (1 L) y de corrida (4 L) se preparan a la concentración final 1x, se filtran por membrana de 0.45  $\mu$ M para desgasificarlos y limpiarlos, siempre deben ser frescos, no reutilizados.

El gel de resolución al 14.5 % se preparó como sigue:

Sol. de acrilamida al 30 %	38.66 mL
Agua dest.	21.11 mL
Tris HCl 1.5 M pH 8.8	20 mL
APS 10%	200 $\mu$ L
TEMED	20 $\mu$ L
Volumen Total	80 mL

El gel de empacamiento al 4 % se preparó como sigue:

Sol. de acrilamida al 30 %	3.67 mL
Agua dest.	12.21 mL
Tris HCl 1.5 M pH 8.8	5 mL
APS 10%	100 $\mu$ L
TEMED	20 $\mu$ L
Volumen Total	20 mL

Ambos geles no llevan SDS, ya que el detergente está presente en el amortiguador de corrida y en el amortiguador de carga de la muestra.

El gel de resolución se prepara sin APS y sin TEMED, se degasifica por 20 min con agitación y vacío, al término se agrega el APS y el TEMED y se carga en el cilindro, se asienta cuidadosamente para eliminar las burbujas y se deja fraguar 12 h.

El gel de empacamiento se prepara y se carga en el cilindro para que fragüe al menos por 6 h.

La muestra proveniente del extracto térmico se preparó en el amortiguador de carga como sigue:

Proteína total	40 a 50 mg
Tris HCl pH 6.8	0.0625 M
Glicerol	10 % (v/v)
$\beta$ -mercaptoetanol	2.5 % (v/v)
SDS	1 % (v/v) de una solución stock al 10 % (v/v)
Volumen total	10 mL

La primera corrida lleva en el amortiguador de carga de la muestra, azul de bromofenol al 0.025 % (v/v) partiendo de una solución stock al 0.5 % (p/v), para detectar el momento en que sale el frente.

El amortiguador de elución de la proteína debe ser de baja fuerza iónica, de conductividad comparable con la del amortiguador de corrida sin SDS.

El ensamblado para fraguar el gel tubular y para hacer la corrida se detallan en el manual de instrucciones del equipo.

De modo adicional se colocó un serpentín de cobre alrededor de la cámara de electroforesis por el que recircula anticongelante a 15 °C para mantener frío el amortiguador de corrida.

## APÉNDICE E

### Matrices de optimización de micro cristales.

Con la solución proteica a 34 mg/mL en amortiguador Tris HCl 0.02 M pH 7.5 con NaCl 0.1 M y ASB14 30 mM hubieron dos hits en el mismo kit JB Screen Membrane 3 (CS-303L):

Hit 1. Solución precipitante de sulfato de amonio 2 M (solución 6 del kit).

Hit 2. Solución precipitante de sulfato de amonio 2 M con amortiguador de nitrato trisódico 100 mM pH 5.6 (solución 7 del kit).

Dadas estas concentraciones de proteína y precipitante se prepararon las siguientes matrices de cristalización:

#### Matriz 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A													} <b>Sulfato de Amonio</b>
B													
C													
D													
E													} <b>Sulfato de Amonio + Citrato Trisódico 100 mM</b>
F													
G													
H													
	<b>3.2</b>	<b>3</b>	<b>2.75</b>	<b>2.5</b>	<b>2.25</b>	<b>2</b>	<b>1.75</b>	<b>1.5</b>	<b>1.25</b>	<b>1</b>	<b>0.75</b>	<b>0.5</b>	<b>M</b>

Desde A1 hasta D12 con sulfato de amonio en gradiente por columnas desde 3.2 hasta 0.5 M

Desde E1 hasta H12 con sulfato de amonio en gradiente por columnas desde 3.2 M hasta 0.5 M incluyendo citrato trisódico 100 mM pH 5.6

Esta caja se colocó con el robot de cristalización Mosquito LCP con la técnica de gota apoyada, que permite hasta 3 concentraciones diferentes de proteína.

Cada celda está subdividida en cuatro cuadrantes, tres de ellos son para colocar la gota apoyada y el cuarto es el pozo para la solución precipitante. En cada celda se colocó 40  $\mu\text{L}$  de solución precipitante en el cuadrante del pozo y tres gotas de 250 nL de solución de proteína a 15, 25 y 35 mg/mL cada gota en los cuadrantes para la gota apoyada.

Matriz 2 y 3

	1	2	3	4	5	6	
A							43 mg/mL
B							35 mg/mL
C							25 mg/mL
D							15 mg/mL
	3	2.5	2	1.5	1	0.5	M

En la matriz dos, la solución proteica se colocó en gradiente por filas desde 43 hasta 15 mg/mL de proteína. La solución precipitante se colocó en gradiente por columnas desde 3 hasta 0.5 M. La técnica fue por gota colgante con pipeteo manual. La gota se formó con 1.5  $\mu\text{L}$  de solución precipitante más 1.5  $\mu\text{L}$  de solución proteica. Se colocó 1 mL de solución reservorio (precipitante).

La matriz tres se preparó igual que la matriz dos excepto que la solución reservorio contenía además citrato trisódico 100 mM pH 5.6

Matriz 4 y 5

	1	2	3	4	5	6	
A							3 M
B							2 M
C							1 M
D							0.5 M
	43	38	30	25	20	15	mg/mL

En la matriz cuatro, la solución proteica se colocó en gradiente por columnas desde 43 hasta 15 mg/mL de proteína. La solución precipitante se colocó en gradiente por filas desde 3 hasta 0.5 M. La técnica fue por gota colgante con pipeteo manual. La gota se formó con 1.5  $\mu$ L de solución precipitante más 1.5  $\mu$ L de solución proteica. Se colocó 1 mL de solución reservorio (precipitante).

La matriz cinco se preparó igual que la matriz cuatro excepto que la solución reservorio contenía además citrato trisódico 100 mM pH 5.6

Las matrices 1, 2, 3, 4 y 5 fueron colocadas el mismo día y se incubaron a 18 °C. Los hits de estas matrices fueron los siguientes:

Matriz 1 15 mg/mL de proteína y Sulfato de amonio 1.25 M

Matriz 2 y 3 15 mg/mL de proteína y Sulfato de amonio 2 y 2.5 M

Matriz 4 y 5 15 mg/mL de proteína y Sulfato de amonio 2 M

En función de estos resultados se prepararon las siguientes matrices, acotando más el rango de la solución proteica y de la solución precipitante:

Matriz 6

	1	2	3	4	5	6	
A							17 mg/mL
B							15 mg/mL
C							12 mg/mL
D							10 mg/mL
	2.5	2.25	2	1.75	1.5	1.25	M

La solución proteica se colocó en gradiente por filas desde 17 hasta 10 mg/mL de proteína. La solución precipitante se colocó en gradiente por columnas desde 2.5 hasta 1.25 M. La técnica fue por gota colgante con pipeteo manual. La gota se formó con 1.5  $\mu$ L de solución precipitante más 1.5  $\mu$ L de solución proteica. Se colocó 1 mL de solución reservorio (precipitante).

Matriz 7

	1	2	3	4	5	6	
A							2.25 M
B							2 M
C							1.75 M
D							1.5 M
	19	17	15	13	11	9	mg/mL

La solución proteica se colocó en gradiente por columnas desde 19 hasta 9 mg/mL de proteína. La solución precipitante se colocó en gradiente por filas desde 2.25 hasta 1.5 M. La técnica fue por gota colgante con pipeteo manual. La gota se formó con 1.5  $\mu$ L de solución precipitante más 1.5  $\mu$ L de solución proteica. Se colocó 1 mL de solución reservorio (precipitante).

Las matrices 6 y 7 fueron colocadas el mismo día y se incubaron a 18 °C. Los hits de estas matrices fueron los siguientes:

Matriz 6      10 mg/mL de proteína y Sulfato de amonio 1.75 M

Matriz 7      9 mg/mL de proteína y Sulfato de amonio 2 M

En función de estos resultados se prepararon las siguientes matrices, acotando más el rango de la solución proteica y de la solución precipitante:

Matriz 8

	1	2	3	4	5	6	
A							1.75 M
B							1.5 M
C							1.25 M
D							1.0 M
	5.5	7	8	9	10	11	mg/mL

La solución proteica se colocó en gradiente por columnas desde 5.5 hasta 11 mg/mL de proteína. La solución precipitante se colocó en gradiente por filas desde 1.75 hasta 1 M. La técnica fue por gota colgante con pipeteo manual. La gota se formó con 1.5  $\mu$ L de solución precipitante más 1.5  $\mu$ L de solución proteica. Se colocó 1 mL de solución reservorio (precipitante).

Esta matriz se incubó a 18 °C y los hits fueron los siguientes:

5.5 mg/mL de proteína con solución precipitante a 1.25 y 1.5 M

7 mg/mL de proteína con solución precipitante a 1.25 y 1.5 M

Matriz 9

	1	2	3	4	5	6	
A							12 mg/mL
B							11 mg/mL
C							10 mg/mL
D							9 mg/mL
	2	1.75	1.5	1.25	1	0.75	M

La solución proteica se colocó en gradiente por filas desde 12 hasta 9 mg/mL de proteína. La solución precipitante se colocó en gradiente por columnas desde 2 hasta 0.75 M. La técnica

fue por gota apoyada con pipeteo manual. La gota se formó con 1.5  $\mu\text{L}$  de solución precipitante más 1.5  $\mu\text{L}$  de solución proteica. Se colocó 1 mL de solución reservorio (precipitante).

Matriz 10

	1	2	3	4	5	6	
A							1.75 M
B							1.5 M
C							1.25 M
D							1.0 M
	13	12	11	10	9	8	mg/mL

La solución proteica se colocó en gradiente por columnas desde 13 hasta 8 mg/mL de proteína. La solución precipitante se colocó en gradiente por filas desde 1.75 hasta 1 M. La técnica fue por gota apoyada con pipeteo manual. La gota se formó con 1.5  $\mu\text{L}$  de solución precipitante más 1.5  $\mu\text{L}$  de solución proteica. Se colocó 1 mL de solución reservorio (precipitante).

Las matrices 9 y 10 las colocó un contacto en la Universidad de Texas y se incubaron a 18 °C. Como no se les puso el vidrio que sella cada pozo, no hubo hits en estas matrices.

Hasta este momento, desde la matriz uno a la ocho, sólo se obtuvieron micro cristales que ya no crecerían más modificando solamente la concentración de la proteína y el precipitante, las siguientes optimizaciones se hicieron modificando el pH y la técnica de cristalización.

Matrices 11, 12, 13 y 14

Las matrices 11 y 12 tuvieron la misma configuración excepto que una fue colocada a 18 °C y la otra a 4 °C, en esta ocasión se cambió el pH de la solución precipitante.

	1	2	3	4	5	6	
A							1.0 M
B							1.2 M
C							1.4 M
D							1.6 M
	3.6	4.5	5.5	6	6.5		pH

La solución proteica se colocó en todos los pozos a 10 mg/mL. El amortiguador que modifica el pH se colocó en gradiente por columnas desde 3.6 hasta 6.5. La solución precipitante se colocó en gradiente por filas desde 1.0 hasta 1.6 M. La técnica fue por gota apoyada con pipeteo manual. La gota se formó con 1.5  $\mu$ L de solución precipitante más 1.5  $\mu$ L de solución proteica. Se colocó 1 mL de solución reservorio (precipitante).

Las matrices 13 y 14 tuvieron la misma configuración que las matrices 11 y 12 excepto que cambió la técnica de siembra, se preparó la gota colgante al igual que en las matrices 11 y 12 y se utilizó además un pelo de caballo con el que se tomaron micro cristales de un pozo anterior para inocular cada gota. Se incubaron en dos temperaturas diferentes, a 18 y 4 °C.

No hubo hits en las matrices 11, 12 13 y 14.

#### Matriz 15

Esta caja se colocó con el robot de cristalización Mosquito LCP con la técnica de gota apoyada, se utilizó el kit de 96 aditivos de Hampton Research (HR2-428) que coinciden en número con los 96 pozos de la placa. En el pozo se colocaron 40  $\mu$ L de solución precipitante de sulfato de amonio 1.5 M. En un cuadrante se colocó la solución proteica a 10 mg/mL sin NaCl ni ASB14 y en otro cuadrante la solución proteica a 9 mg/mL más NaCl 0.1 M y ASB14 30 mM, el aditivo se agregó al 30 % en el pozo de la solución precipitante. Cada gota apoyada

se formó con 200 nL de la solución proteica y 200 nL de la solución de cada pozo. En este caso hubo dos gotas diferentes en cada celda. Se incubó la placa a 18 °C. No hubo hits en esta matriz.

Matriz 16

	1	2	3	4	5	6	
A							20 mg/mL
B							15 mg/mL
C							10 mg/mL
D							5 mg/mL
	2.5 2 1.5 1.0 0.5 0.25 M						

La solución proteica se colocó en gradiente por filas desde 20 hasta 5 mg/mL de proteína. La solución precipitante se colocó en gradiente por columnas desde 2.5 hasta 0.25 M. La técnica fue por gota apoyada con pipeteo manual. La gota se formó con dos gotas separadas de 1.5 µL de solución precipitante más 1.5 µL de solución proteica, después se unieron las gotas con un pelo de caballo para que la difusión de las dos soluciones fuera lenta. Se colocó 1 mL de solución reservorio (precipitante).

Matriz 17 y 18

Para esta matriz se usó una placa Terasaki con la técnica de micro lote. Se utilizó como solución precipitante la solución 33 del kit Memb Fac HR2-114 de Hampton Research, que contiene sulfato de amonio 0.1 M, HEPES 0.1 M pH 7.5 y PEG 400 al 18 %.

La solución proteica se preparó con amortiguador Tris HCl 0.02 M y NaCl 0.1 M, la variación se le hizo a la concentración de ASB14.

	A	B	C	D	E	F	
1							20 mM
2							
3							
4							15 mM
5							
6							
7							10 mM
8							
9							
10							5 mM
11							
12							
	35	30	25	20	25	10	mg/mL

La solución proteica se colocó en gradiente por columnas desde 35 hasta 10 mg/mL de proteína. El ASB14 en la solución precipitante se colocó en gradiente por filas desde 20 hasta 5 mM, en bloques de tres filas. La técnica fue por gota apoyada con pipeteo manual. La gota se formó con 1  $\mu$ L de solución precipitante más 1  $\mu$ L de solución proteica y se cubrió con 13  $\mu$ L de parafina. Se incubó a 18 °C.

La matriz 18 se preparó en la misma forma sólo que se incubó a 4 °C. No hubo hits.

#### Matriz 19

Se preparó una matriz donde se puso como variable los días de incubación. Se utilizó la solución proteica a dos concentraciones 8 y 9 mg/mL en amortiguador Tris HCl 0.02 M pH 7.5, NaCl 0.1 M y ASB14 30 mM. Se utilizó como solución precipitante sulfato de amonio 1.5 M. La técnica fue por gota apoyada con pipeteo manual. La gota se formó con 1.5  $\mu$ L de solución precipitante más 1.5  $\mu$ L de solución proteica. Se colocó 1 mL de solución reservorio (precipitante).

	1	2	3	4	5	6	
A							} 8 mg/mL
B							
C							} 9 mg/mL
D							
	17	14	11	8	4	3	d

Con esta matriz se buscó hallar el tamaño adecuado de los micro cristales para la técnica de difracción de electrones, los cristales debían estar entre 100 y 200 nm. Se obtuvieron cristales de entre 10 y 20 nm.

## APÉNDICE D

Preparación de soluciones para extracción de ADN cromosómico por el método de Tritón-Prep

### A) Solución amortiguadora STET

Componente	Concentración
Sacarosa	8 % (p/v)
Tritón X-100	5 % (v/v)
EDTA	50 mM
Tris HCl pH 8.0	50 mM

Preparar una solución stock de EDTA 1.5 M, medir el pH y agregar hojuelas de NaOH hasta ajustar el pH a 8.0

Preparar una solución stock de Trizma base 1.5 M, medir el pH y agregar HCl concentrado hasta ajustar el pH a 8.0

Con la fórmula  $V_1 C_1 = V_2 C_2$  calcular el volumen necesario de ambas soluciones stock.

Pesar la sacarosa, disolver, agregar el Tritón X-100, mezclar cuidadosamente, aforar al volumen final. Esterilizar por filtración con membrana de nitrocelulosa de 0.22  $\mu\text{m}$  en un frasco limpio esterilizado por autoclave.

### B) Solución Lisozima/Ribonucleasa

Componente	Concentración
Lisozima	10 mg/mL
Ribonucleasa grado biología molecular	1 mg/mL
Tris – HCl pH 8.0	50 mM

Pesar la lisozima y la RNAsa, disolver en amortiguador TrisHCl 50 mM pH 8.0 y almacenar a  $-20^{\circ}\text{C}$  en alícuotas, no volver a congelar.

## APÉNDICE E

### Electroforesis de geles de agarosa (1%)

#### Amortiguador TAE 50x (Solución Stock)

Trizma base	242 g
Ácido acético glacial	57.1 mL
EDTA 0.5 M (pH 8.0)	100 mL

Mezclar los componentes y aforar a 1 L, conservar a temperatura ambiente.

#### Preparación del gel de agarosa al 1%

Pesar 0.3 g de agarosa grado electroforesis y disolver en 30 mL de amortiguador TAE 1x mediante calentamiento en horno de microondas, por 40 s en potencia alta. Verificar la perfecta disolución. Agregar 2  $\mu$ L de bromuro de etidio, mezclar cuidadosamente y dejar gelificar en un soporte de 7.0 x 7.0 cm (con peine) por 40 min para obtener un gel de 0.75 cm de espesor.

Preparar amortiguador TAE 1X adicional para llenar la cámara de electroforesis y hacer la corrida a 100 V por cerca de 20 a 25 min.

#### Amortiguador de carga de la muestra 6x.

Azul de bromofenol            0.25% (p/v)

Xilen cianol                    0.25% (p/v)

Glicerol en H<sub>2</sub>O                30% (v/v)

## APÉNDICE F

Distribución de tamaño de los valores reportados en la Tabla 6.8

