Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
Facultad de Ciencias Químicas
Licenciatura en Químico Farmacobiólogo

Sobreproducción de la leucín aminopeptidasa yspII de la levadura *Schizosaccharomyces pombe* y purificación por cromatografía de afinidad con metales inmovilizados

TESIS

Para obtener el título de:

Licenciatura en Químico Farmacobiólogo

Presenta:

Verónica Acocal González

Directora de tesis:

Dra. Irma Herrera Camacho
Laboratorio de Bioquímica y Biología molecular
Centro de Química ICUAP

Asesor interno:

Dra. Patricia Aguilar Alonso
Departamento de Bioquímica Alimentos
Facultad de Ciencias Químicas. BUAP

Puebla, Pue. Septiembre 2015

Esta tesis fue realizada en el Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular del Centro de Química del Instituto de Ciencias BUAP, bajo la dirección de la Dra. Irma Herrera Camacho (PI Titular C TC).

Un reconocimiento especial a la Dra. Nora Hilda Rosas Murrieta por su apoyo académico y técnico a lo largo del desarrollo de esta tesis.

Este trabajo fue parte de un proyecto de investigación, el cual fue apoyado financieramente por:

- Programa de apoyo a Proyectos de Investigación. VIEP-BUAP
  Proyectos: HECI-NAT 2014 y 2015
- Redes Temáticas-PROMEP-SEP. CA: Bioquímica y Biología Molecular.
  Proyecto: 2013-2014.

Agradezco las becas recibidas durante el desarrollo de mi tesis:

- Beca de terminación de tesis: Proyectos VIEP 2014-2015.
- Beca Jóvenes Investigadores Otoño-2014

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Irma Herrera Camacho por elegirme y confiarme este proyecto, por guiarme durante todo este tiempo con paciencia y sabiduría. Muchas gracias.

A la Dra. Nora Rosas por todo el apoyo brindado durante la realización de esta tesis.

Un agradecimiento especial a José Luis y Nessie, por haber sido los primeros en guiarme en el trabajo del laboratorio y por haberme brindado su amistad incondicional.

A todos los estudiantes que conocí durante mi estancia: Ceci, Adrián, Jazmín, Tulio, Hugo, Alfredo, Ana, por haber hecho que la estancia en el laboratorio fuera más amena.

A todos los que trabajan y conforman el laboratorio de Bioquímica y Biología molecular.

A mi familia

A mi mamá Celia, por todo el amor y la paciencia que me tiene. A mi tía Azul, por todos los buenos consejos que me ha dado y por ser el ejemplo que siempre ha sido para mí. A mi papá Raúl, por preocuparse y estar siempre al pendiente de mí. A mis queridos hermanos Raúl y Miguel Ángel, por saber cómo hacerme reír. Gracias a todos por haberme dejado elegir mi camino y apoyarme incondicionalmente. Todo lo que soy se lo debo a ustedes.

Finalmente, quisiera darle las gracias a Dios por darme la oportunidad de vivir todas las experiencias que me ha tocado experimentar, cada cosa a su tiempo, porque he aprendido que los tiempos de Dios son perfectos.

ÍNDICE

ABREVIATURAS

RESUMEN

1. INTODUCCIÓN 1

1.1 Proteólisis 1

1.1.1 El sistema lisosomal/autofágico 2

1.1.2 El sistema ubiquitina-proteasoma 3

1.1.2.1 El proteasoma 4

1.1.3 Señales químicas para el recambio proteico 5

1.2 Proteasas 8

1.2.1 Clasificación de las proteasas 9

1.3 Aminopeptidasas 12

1.3.1 Leucin aminopeptidasas 14

1.4 Las levaduras 16

1.5 *Schizosaccharomyces pombe* 17

1.5.1 El sistema proteolítico de *Schizosaccharomyces pombe* 21

1.6 Leucin aminopeptidasa yspII 22

2. JUSTIFICACIÓN 25

3. OBJETIVOS 26

3.1 General..... 26

3.2 Particulares 26

4. ESQUEMA DE TRABAJO 27

5. MATERIALES Y MÉTODOS 28

5.1 Material biológico 28

5.2 Material y reactivos 28

5.3 Métodos..... 28

5.4 Soluciones y medios de cultivo 29

5.5 Amplificación y purificación del vector pRSPLAPII-H 29

5.6 Digestiones del vector pRSPLAPII-H 30

5.7 Transformación de levaduras con el vector pRSPLAPII-H 31

5.8 Sobreexpresión de la LAPyspII-H 31

5.9 Obtención del extracto soluble 32

5.10 Precipitación con sulfato de amonio 33

5.11 Cromatografía de exclusión molecular Sephadex G-200 34

5.12 Cromatografía de afinidad IMAC Ni-NTA 34

5.13 Determinación de proteínas totales 35

5.14 Determinación de actividad enzimática 37

5.15 Precipitación de proteínas con acetona..... 38

5.16 Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes PAGE-SDS 39

5.17 Tinción con azul de coomassie 39

5.18 Inmunoblotting. Western blot 40

5.19 Revelado con luminol (quimioluminiscencia) 41

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 42

6.1 Purificación y verificación de la construcción del vector pRSPLAPII-H 42

6.2 Obtención de las cepas de *S. pombe* sobreproductoras de la LAPyspII (cepa diploide 826 y cepa haploide 4X) 43

6.3 Producción de la LAPyspII-H en las diferentes cepas sobreproductoras 45

6.4 Condiciones óptimas de producción de la LAPyspII en diferentes etapas del crecimiento celular 47

6.5 Purificación de la LAPyspII-H 50

6.6 Precipitación con sulfato de amonio a saturación 51

6.7 Cromatografía de exclusión molecular 53

6.8 Cromatografía de afinidad con metales inmovilizados (IMAC) con Ni-NTA.. 57

6.9 Identificación de la LAPyspII por Western-blot y grado de pureza en la purificación..... 60

7. CONCLUSIONES 64

8. PERSPECIVAS 65

9. BIBLIOGRAFÍA 66

10. ANEXOS 69

10.1 Anexo 1 69

10.2 Anexo 2 73

10.3 Anexo 3 75

10.4 Anexo 4 75

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
LAP	Leucin aminopeptidasa
LAPyspII	Leucin amninopeptidasas II de la levadura *Schizosaccharomyces pombe*
pb	pares de bases
kDa	kilodalton
PAGE-SDS	Electroforesis en gel de acrilamida con dodecil sulfato de sodio
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PVDF	Difluoruro de polivinilideno
IMAC	Cromatografía de afinidad con metales inmovilizados
NTA	Ácido nitriloacético
ORF	Marco abierto de lectura
NC-IUBMB	Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología molecular

RESUMEN

La leucin amninopeptidasa yspII (LAPyspII) de *Schizosaccharomyces pombe*, es una exopeptidasa perteneciente a la familia M17 de las metalopeptidasas. Hidroliza residuos de leucina del extremo N-terminal de las proteínas, con pH óptimo de 8.5 y es dependiente de Mn^{2+}. Presenta una masa molecular de 320 kDa siendo una proteína hexamérica cuyas subunidades son de 54 kDa. Está codificada por el gen *ape2*$^{+}$ localizado en el cromosoma I. A partir de las estructuras cristalizadas de la LAP de bovino y la LAP de *E. coli* se construyó un modelo *in-silico* de la LAPyspII teniendo el sitio activo en el dominio C-terminal en donde la Lys292 tiene un papel fundamental en la catálisis. En trabajos precedentes en el laboratorio se obtuvieron cepas mutantes de *S. pombe* por eliminación de la expresión del gen *ape2*$^{+}$, donde se observó una velocidad de crecimiento disminuida de la cepa mutante con respecto a la cepa original por lo que se ha propuesto que la LAPyspII tiene un papel importante en procesos de división celular.

El objetivo del presente trabajo fue obtener cepas de *Schizosaccharomyces pombe* sobreproductoras de la LAPyspII con un motivo de 6 histidinas en el extremo N-terminal (LAPyspII-H), sobreproducir la LAPyspII-H y lograr purificarla por cromatografía de afinidad con metales inmovilizados.

Se evaluaron las cepas sobreproductoras 3DpLAPII-H obtenida en trabajos precedentes y dos cepas sobreproductoras de la LAPyspII-H obtenidas en el presente trabajo, la cepa diploide 826pLAPII-H y la cepa haploide 4XpLAPII-H; observando que la cepa sobreproductora 3DpLAPII-H es un mejor sistema de expresión, obteniendo una sobreproducción de la LAPyspII-H del 157% con respecto a la cepa no transformada ($3Dh^{-}$).

Para la purificación de la LAPyspII-H se partió de la cepa sobreproductora 3DpLAPII-H de *S. pombe*, se obtuvo el extracto enzimático soluble y éste se fraccionó con sulfato de amonio del 0-40% y del 40-80%. Con este paso se logró concentrar la enzima para la cromatografía de filtración molecular (Sephadex G-200), esta cromatografía se utilizó con la finalidad de eliminar cualquier proteína que interfiriera con la cromatografía de afinidad con metales inmovilizados IMAC Ni-NTA. En el PAGE-SDS se observaron 2 bandas alrededor de los 50 y 54 kDa, comprobando por western blot que ambas bandas pertenecen a la LAPyspII-H y obteniendo señales en pesos menores, lo que indica una degradación de la enzima.

1. INTRODUCCION

Las proteínas son las macromoléculas biológicas más abundantes de las células, están presentes en todas las éstas y en todas las partes de las mismas. Presentan una gran variedad; en una sola célula se pueden encontrar miles de clases de proteínas diferentes, que varían de tamaño desde péptidos relativamente pequeños hasta polímeros enormes. Además, muestran una gran variabilidad en cuanto a su función biológica. Las proteínas son los instrumentos moleculares mediante los cuales se expresa la información genética (Lehninger, 2005).

1.1 Proteólisis

La concentración celular de cada clase de proteína es consecuencia del equilibrio entre su síntesis y su degradación, proceso que recibe el nombre de recambio proteico. El recambio proteico tiene varios fines: la flexibilidad metabólica, que se consigue mediante cambios relativamente rápidos de la concentración de enzimas reguladoras, hormonas peptídicas y moléculas receptoras. El recambio proteico protege también a las células de la acumulación de proteínas anómalas. Finalmente, numerosos procesos fisiológicos dependen tanto de las reacciones de degradación oportunas como de las de síntesis. El recambio proteico constituye también un camino para la adaptación celular a las modificaciones de las condiciones ambientales (Rodríguez, 2003).

Como todos los demás componentes intracelulares, las proteínas están sujetas a la acción de la influencia del medio, fundamentalmente las especies reactivas de oxígeno, que pueden influir en su estructura, conformación y actividad biológica. La capacidad de las proteínas para reparar el daño es limitada por lo que el recambio proteico puede verse como un sistema de control de calidad en el que una molécula proteica defectuosa marcada es degradada por una enzima proteolítica en un proceso que recibe el nombre de proteólisis.

La proteólisis es un proceso catabólico realizado por enzimas proteolíticas, proteasas o peptidasas las cuales hidrolizan enlaces peptídicos formando péptidos de menor tamaño o liberando aminoácidos, estas no requieren de coenzimas y bajo determinadas condiciones requieren de un ion metálico (Mathews y col., 2002).

El procesamiento proteolítico puede estar limitado por la especificidad de la proteasa, la accesibilidad del enlace peptídico susceptible del sustrato, la activación obligatoria de un precursor de enzima, la acción de proteasas inhibitorias, o una combinación de estos factores. La proteólisis limitada es el último paso en la síntesis de muchas proteínas biológicamente activas, participando en la obtención de proteínas activas como las proteínas de la coagulación o insulina, así como la obtención de neuropéptidos activos**.** Probablemente la proteólisis limitada es también el primer paso en la degradación de proteínas (Neurath, 1999; Neurath y Walsh, 1976).

Dos sistemas proteolíticos principales son los responsables del recambio de proteínas intracelular: el sistema lisosomal y el sistema ubiquitina – proteasoma.

1.1.1 El sistema lisosomal/autofágico

El término autofagia se refiere a cualquier proceso resultante en la degradación de componentes intracelulares dentro de los lisosomas o de la vacuola. Los lisosomas son orgánulos de membrana sencilla, que contienen una gran variedad de hidrolasas capaces de degradar cualquier tipo de macromoléculas. Las macromoléculas extracelulares también pueden ser internalizadas y degradadas en los lisosomas a través de lo que se conoce como heterofagia. Por último, algunas proteínas extracelulares, tales como proteínas secretoras, llegan a sufrir degradación lisosomal en las células en las que se sintetizan, por la fusión de vesículas secretoras con los lisosomas en lugar de la membrana plasmática. Este proceso, conocido como crinofagia, es un mecanismo común utilizado por las células secretoras para modular las tasas de secreción.

La autofagia contribuye al recambio de los componentes celulares, es estimulada en respuesta a cambios en las condiciones ambientales y diferentes factores de estrés, tales como la limitación de nutrientes, la acumulación de proteínas mal plegadas, estrés oxidativo, cambio en el volumen celular, y la fluctuación en los niveles hormonales. Recientemente se ha establecido una conexión entre la autofagia y diversos procesos fisiológicos, incluyendo diferenciación, desarrollo y crecimiento celular, muerte celular programada, inmunidad innata, defensa por la infección de patógenos y el envejecimiento (Martínez, 2005).

1.1.2 El sistema ubiquitina – proteasoma

Dos pasos importantes están implicados en esta vía, el etiquetado de los sustratos para su degradación y su degradación proteolítica, se alcanzan a través de la función coordinada de sus principales componentes, la conjugación de ubiquitina y el proteasoma.

En la mayoría de casos, las proteínas deben ser “etiquetadas” con el fin de ser reconocidas y degradadas por el proteasoma. La fosforilación y la unión covalente de ubiquitina (ubiquitinación) son las etiquetas más comunes utilizadas. Tres clases de enzimas, E1, E2 y E3 son responsables de la conjugación de ubiquitina (Ub). En una reacción dependiente de ATP, la enzima activadora de Ub, E1, activa la ubiquitina para formar el enlace E1- tiol - éster - Ub; esta ubiquitina activada se une covalentemente a la proteína diana por la enzima transportadora de Ub, E2; el tercer grupo de enzimas, E3, proteína ligasa de Ub, "presenta" el sustrato a E2 para la conjugación. E3 tienen así dos dominios funcionales, uno que facilita el reconocimiento específico del sustrato, y un segundo directamente implicado en la unión del sustrato a E2. La fijación de nuevas moléculas de Ub a la inicial para formar cadenas de poliubiquitina normalmente se logra mediante el paso repetido a través de la E1- E2 -E3 (Martínez, 2005). En la figura 1 se presenta el mecanismo implicado en tipo de proteólisis

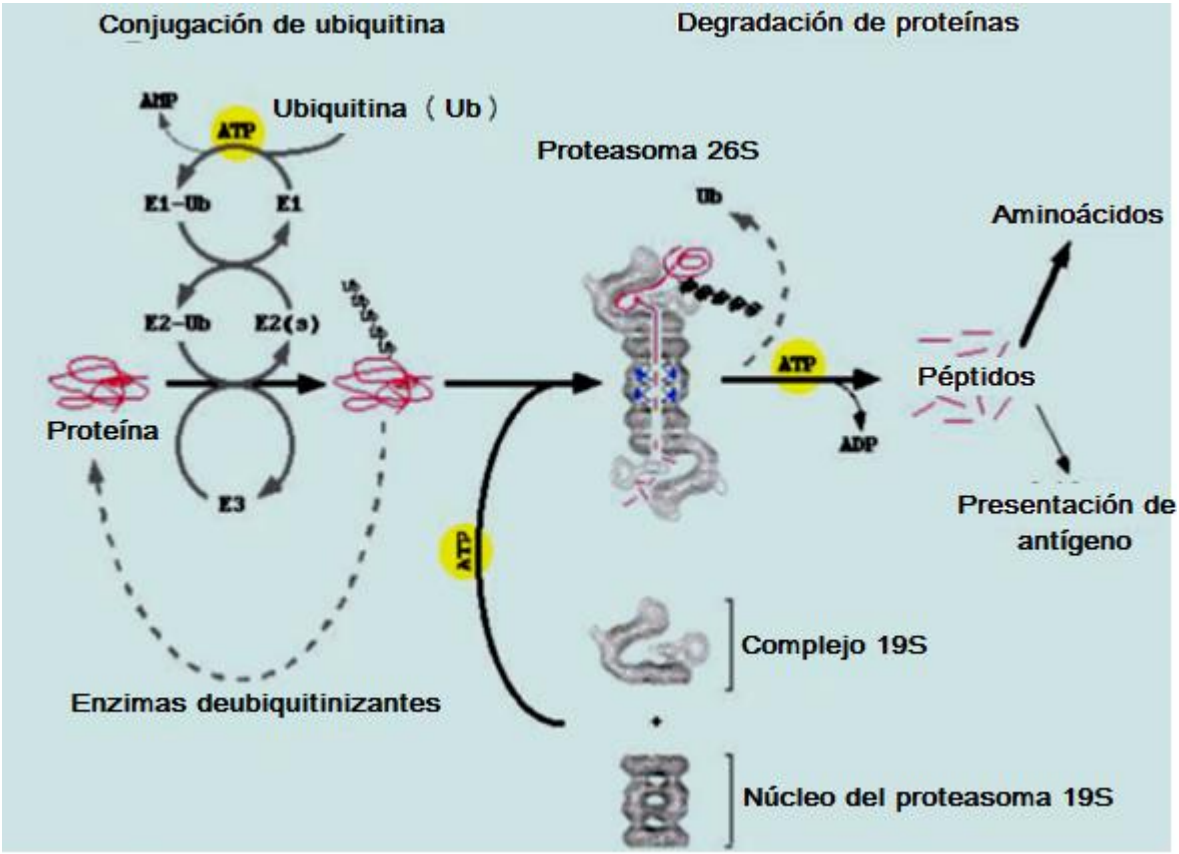


Figura 1. Representación esquemática de la ruta de degradación proteica dependiente de ubiquitina (Rodríguez, 2003).

1.1.2.1 El proteasoma

El componente proteolítico del sistema ubiquitina-proteasoma es el proteasoma, un complejo enzimático multicatalítico conservado en procariotas y eucariotas. Diferentes combinaciones de un núcleo catalítico (proteasoma 20S) y varios tipos de subunidades reguladoras (19S y 11S) dan lugar a los distintos tipos de proteasomas intracelulares. El proteasoma 26S es el mejor caracterizado, resulta de la unión del núcleo catalítico y dos subunidades reguladoras 19S. La mayoría de las proteínas poliubiquitinadas son reconocidas y degradadas por el proteasoma 26S. El proteasoma 20S de mamífero es una estructura cilíndrica compuesta por cuatro anillos, cada anillo contiene siete subunidades diferentes (Attaix y col., 2002).

Los anillos exteriores se componen de subunidades α, y los dos anillos interiores de β - subunidades, que contienen los sitios catalíticos (Figura 2). Los substratos deben entrar en la cámara catalítica con el fin de ser degradados a péptidos. El proteasoma hidroliza los enlaces peptídicos y genera péptidos que contienen de 3 a 22 aminoácidos de longitud y no conservan sus propiedades biológicas (Martínez, 2005; Attaix y col., 2002).

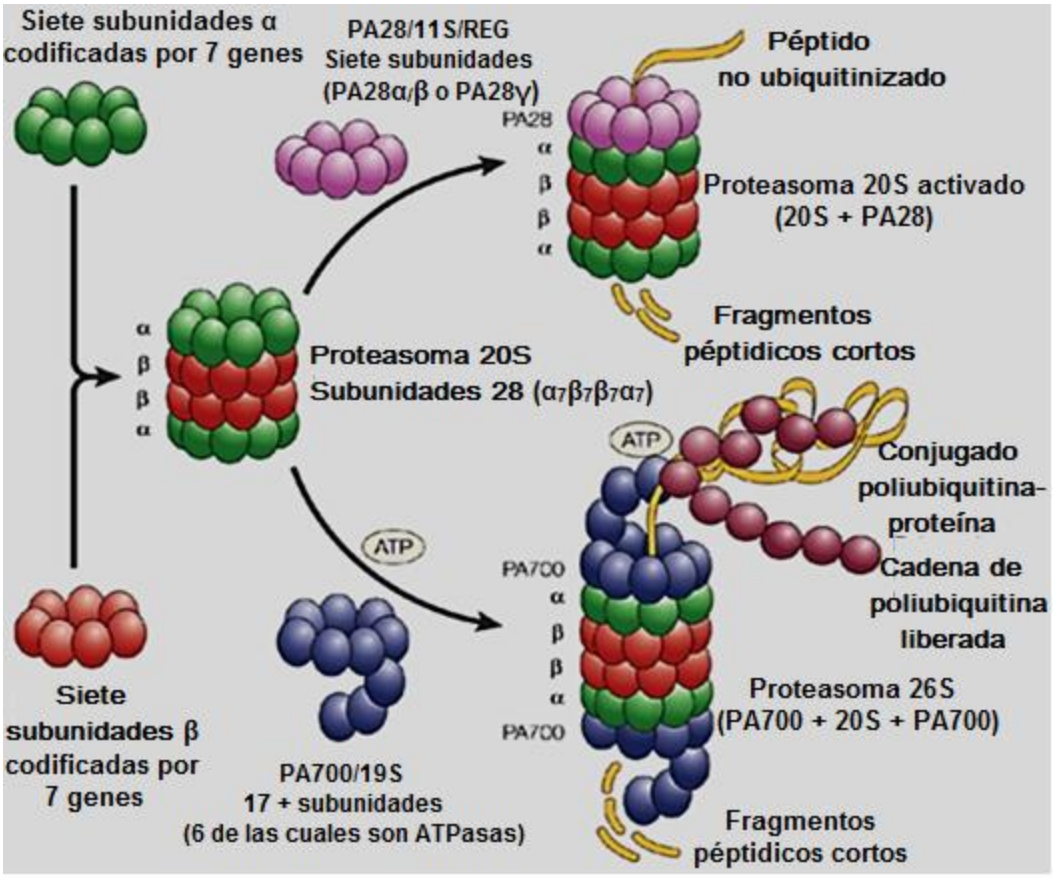


Figura 2. Composición y organización de los proteosomas (Rodríguez, 2003).

1.1.3 Señales químicas para el recambio proteico

En la actualidad se conocen hasta seis características estructurales a las que se consideran factores determinantes de la tasa de recambio: ubiquitinación, oxidación de determinados residuos, secuencias PEST, cajas de destrucción de ciclinas, determinados residuos N-terminales y la presencia del pentapéptido KFERQ.

Ubiquitinación

La ubiquitina es una proteína pequeña (76 aminoácidos) que se encuentra en todas las células eucariotas y debe su nombre a su amplia distribución. Pertenece a una clase de proteínas que se denominan proteínas de agresión o proteínas de choque térmico (hsp), ya que su síntesis se acelera o se inicia cuando las células son agredidas. La ubiquitina experimenta una reacción dependiente de ATP con las proteínas, que condensa los residuos de glicina C-terminales de la ubiquitina con grupos amino de lisina de la proteína a marcar. Estas proteínas modificadas se degradan poco después por el complejo proteolítico proteosoma 26S que reconoce al marcador ubiquitina (Rodríguez, 2003).

Residuos oxidados

Los residuos de aminoácidos oxidados (es decir los residuos que están alterados por oxidasas o por ataque de ROS) promueven la degradación proteica. Se ha demostrado que muchas proteínas experimentan una oxidación en determinados residuos promovida por condiciones que generan ROS.

Algunos metales como el Fe^{2+} son esenciales en el proceso y los residuos de lisina, arginina y prolina los más susceptibles a la oxidación. Estas modificaciones marcan a estas proteínas para su posterior degradación por las proteasas citosólicas. La acumulación de proteínas con daños oxidativos más allá de la capacidad de la célula para degradarlas y sustituirlas, parece que contribuye de manera importante al envejecimiento celular (Starkova y col., 1999).

Secuencias PEST

Proteínas con una vida media menor de 2 horas son ricas en regiones que contienen los aminoácidos prolina, glutamato, serina y treonina (P, E, S y T, respectivamente). A estas regiones, de entre 12 y 60 residuos de longitud, se las conoce como secuencias PEST. Son muy pocas las proteínas de vida media larga que contienen estas regiones.

Parece probable que las regiones PEST formen parte de un esquema de reconocimiento para los sistemas enzimáticos que degradan las proteínas de vida media corta, que posiblemente incluya el sistema de marcado de la ubiquitina (Starkova y col., 1999).

Ciclinas y cajas de destrucción

Las ciclinas son proteínas relacionadas con el control del ciclo celular de eucariotas que han de ser degradadas para que la célula continúe desde metafase a anafase. Se trata, pues, de una degradación muy controlada, dependiente de un paso previo de marcado de la ciclina con ubiquitina. En casi todas las ciclinas se ha localizado una secuencia señal (caja de destrucción) formada por 9 aminoácidos (RAALGNISN) que se encuentra presente entre los residuos 13 y 66 de la secuencia proteica (Starkova y col., 1999).

Residuos N-terminales

El residuo N-terminal de una proteína es parcialmente responsable de su susceptibilidad a la degradación. Un residuo N-terminal de Phe, Leu, Tyr, Trp, Lys, Arg, Ile o His está relacionado con una vida metabólica corta, mientras que las proteínas con otros aminos terminales tienen una vida más prolongada. Otros grupos N-terminales producen desestabilización de la proteína tras su modificación. Estas observaciones, que se realizaron inicialmente en proteínas naturales, se han visto confirmados por experimentos en los que se alteró el residuo N-terminal mediante mutagénesis dirigida, lo cual produjo cambios correspondientes de la vida media de las proteínas mutantes. En algunos casos, parece ser, que este factor también implica al sistema de la ubiquitina (Starkova y col., 1999).

Pentapéptido KFERQ

Son secuencias peptídicas que marcan proteínas citosólicas para su proteólisis lisosomal, siendo esta secuencia una de las señales para que las proteínas entren en los lisosomas. Este marcaje de proteínas no está relacionado con la ubiquitina,

pero existen otras hsp (hsp73 citosólica e intralisosómicas) que reconocen estas secuencias (Rodríguez, 2003).

1.2 Proteasas

Las proteasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de los enlaces peptídicos de proteínas. Las proteasas inician, modulan y terminan una amplia variedad de importantes funciones celulares que conllevan el procesamiento de moléculas bioactivas, por lo tanto, controlan procesos biológicos esenciales, como replicación, progresión del ciclo celular, proliferación, diferenciación y migración, morfogénesis y remodelado tisular, extensión neuronal, hemostasia, cicatrización de heridas, inmunidad, angiogénesis y apoptosis (López Otín y Overall, 2002).

Las proteasas realizan modificaciones altamente específicas y selectivas de las proteínas tales como la activación de formas zimógenas de las enzimas por proteólisis limitada, coagulación sanguínea, lisis de los coágulos de fibrina y el procesamiento y transporte de proteínas de secreción a través de las membranas. Las proteasas ejecutan una gran variedad de funciones, que se extienden desde el nivel celular hasta el nivel del organismo, para producir sistemas en cascada como la hemostasia y la inflamación. Son responsables de los complejos procesos de la fisiología normal de las células así como de las condiciones fisiopatológicas. Su participación en el ciclo de vida de los organismos causantes de enfermedades les ha llevado a convertirse en un potencial objetivo para el desarrollo de agentes terapéuticos contra enfermedades mortales tales como el cáncer y el SIDA. Considerando la relevancia funcional de las proteasas para todos los procesos de la vida incluyendo la muerte celular, no es difícil entender que la deficiencia o una actividad temporal mal dirigida de estas enzimas subyacen en varias condiciones patológicas como el cáncer, artritis, enfermedades neurogenerativas y cardiovasculares (Rao y col., 1998; López Otín y Overall, 2002).

Las proteasas son enzimas que se encargan de romper enlaces peptídicos y para esto requieren la polarización de este enlace a través de un ataque nucleofílico sobre el carbono carbonilo, en una reacción mediada por una molécula de agua y

ayudado electrofílicamente por la remoción de un protón del nitrógeno peptídico que se transfiere a una molécula HA.

El ataque nucleofílico involucra también la donación de un protón nucleofílico atacante para que se incremente la polarización del enlace C-O y permitir la formación de un intermediario tetraédrico, que una vez roto facilitará la salida de una amina (figura 3).

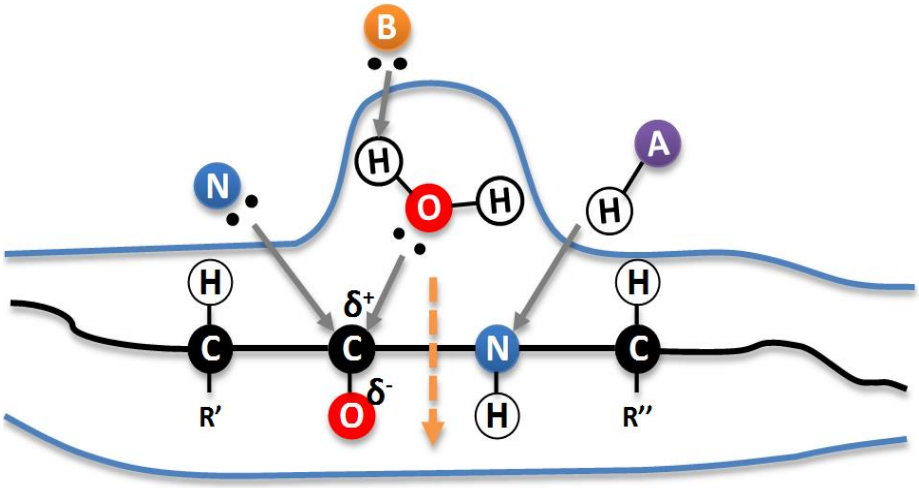


Figura 3. Mecanismo general de la hidrólisis enzimática del enlace peptídico. Tomado y modificado de Rawlings y Salvesen, 2009.

1.2.1 Clasificación de las proteasas

Una clasificación inicial de las proteasas de acuerdo a la posición a escindir implica su división en exoproteasas y endoproteasas:

Las endopeptidasas catalizan la hidrólisis de enlaces peptídicos situados preferentemente en el interior de la cadena polipeptídica y son capaces de degradar las proteínas hasta péptidos (Betancourt, 2009).

Las exopeptidasas hidrolizan exclusivamente enlaces peptídicos situados en el extremo amino o carboxilo terminal de la cadena polipeptídica, liberando aminoácidos terminales de las proteínas. Este grupo comprende:

Aminopeptidasas (L-aminoacil péptido hidrolasas EC 3.4.11): catalizan la reacción de liberación secuencial de aminoácidos del extremo amino terminal.

Carboxipeptidasas (peptidilaminoácido hidrolasas EC 3.4.12): catalizan la liberación secuencial de aminoácidos del extremo carboxilo terminal.

El estudio de las proteasas se inició analizando la especificidad que presentan por el substrato, el cual se encuentra definido por la secuencia blanco. Posteriormente apareció el uso de inhibidores de la actividad de la proteasa y de esta manera se observó su mecanismo de acción y la relación de la estructura; su función biológica fue determinada gracias a la cinética enzimática, la clonación de genes y la mutagénesis dirigida; de esta manera se determina la existencia de familias de proteasas con estructuras y mecanismos de acción similares en diferentes tipos celulares. Gracias a lo anterior las proteasas se han convertido en un campo prolífico para la investigación (Beyond y Bond, 1998).

Las enzimas proteolíticas poseen un alto grado de especificidad para restringir su acción a sitios particulares de los sustratos proteicos. Por esta razón, el Comité de Nomenclatura (NC) de la Unión internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB, 1984) estableció una clasificación más específica basada en su estructura tridimensional, en la composición de los sitios activos, en su comportamiento frente a sus inhibidores y su mecanismo de acción. Esta clasificación considera a seis familias como se muestra en la tabla 1.

A continuación se describe el mecanismo de acción de las proteasas mencionadas:

Serín-proteasas

Usualmente siguen una reacción en dos pasos para la hidrolisis, en el que un intermediario enzima-péptido se forma con la pérdida de aminoácidos o fragmentos peptídicos. La primera etapa consiste de una acilación que es seguida por una desacilación, proceso que ocurre por un ataque nucleofílico en el intermediario mediada por una molécula de agua, resultando en la hidrolisis del péptido. Las serín endopeptidasas pueden ser clasificadas en tres grupos basados principalmente en la preferencia de su substrato primario: tipo tripsina, que hidrolizan después de residuos cargados positivamente; tipo quimotripsina, que

hidrolizan después de grandes residuos hidrofóbicos; y tipo elastasa, que hidrolizan después de pequeños residuos hidrofóbicos.

Tabla 1. Clasificación de las proteasas de acuerdo con NC-IUBMB (Beyond y Bond, 1998).

Familia	Proteasa representativa	Residuos característicos (Sitio activo)	Inhibidores característicos
Serín proteasas I	Quimitripsina	Asp^{102}, Ser^{195}, His^{57}	DFP, PMSF, TLCK
Serín proteasas II	Subtilisina	Asp^{32}, Ser^{221}, His^{64}	DFP, PMSF, TLCK
Cisteín proteasas	Papaína/ Caspasas	Cis^{25}, His^{159}, $Asp1^{58}$	Iodoacetato, PCMB, PHMB, N-etilmaleimida, E64
Aspártico protesas	Penicilopepsina	Asp^{33}, Asp^{213}	Pepstatina A
Metaloproteasas I	Carboxipeptidasa A de bovino	Zn, Glu^{270}, Tyr^{248}	EDTA, EGTA, 1-10 fenantrolina, cloroquina
Metaloproteasas II	Termolisina	Zn, Glu^{147}, His^{231}	EDTA, EGTA, 1-10 fenantrolina, cloroquina

Cisteín-proteasas

Son proteasas que catalizan la hidrolisis de derivados de ácido carboxílico a través de una vía de doble desplazamiento que implica la formación de ácido-base y la hidrólisis de un intermediario acil-tiol. El mecanismo de acción es muy similar al de las serín proteasas. El paso inicial del proceso catalítico implica la unión no covalente de la enzima y del substrato para formar un complejo. Seguido de la acilación de la enzima, con la formación y liberación de un primer producto, la amina R´-NH2. En el siguiente paso de desacilación, la enzima reacciona con la molécula de agua para liberar el segundo producto, con la regeneración de la enzima libre (Rao y col., 1998).

Aspartato-proteasas

Estas enzimas dependen de los residuos de ácido aspártico para su actividad catalítica. Estudios cristalográficos han mostrado que estas enzimas son bilobuladas con el sitio activo localizado entre lóbulos y cada lóbulo contribuye con uno de los pares de residuos de ácido aspártico esencial para la actividad catalítica. Estudios cinéticos y cristalográficos también sugieren que el mecanismo involucra la catálisis acido-base con una molécula de agua que participa directamente en la reacción (Rao y col., 1998).

Metaloproteasas

Estas enzimas dependen de la presencia de cationes divalentes y pueden ser inactivadas por diálisis o por la adición de agentes quelantes. Estudios de rayos X han demostrado la presencia de Glu en el centro activo que asiste un ataque nucleofílico en el carbono carbonilo del enlace peptídico a escindir mediado por una molécula de agua y que se polariza por el ion Zn^{2+}. Muchas de las metaloproteasas son enzimas que contienen el motivo His-Glu-Xaa-Xaa-His formando parte del sitio de enlace del metal, usualmente zinc (Rao y col., 1998).

1.3 Aminopeptidasas

Las aminopeptidasas catalizan la hidrólisis de los enlaces peptídicos del extremo N-terminal de péptidos y proteínas (Taylor, 1993).

Las aminopeptidasas están clasificadas por:

1) El número de aminoácidos que hidrolizan del amino terminal de los sustratos.
2) Con respecto a la eficiencia relativa con la cual los residuos son removidos.
3) Con respecto a la localización de la aminopeptidasas.
4) Por su susceptibilidad a ser inhibidos por bestatina.
5) De acuerdo al ion metálico contenido y/o los residuos que enlazan el metal a la enzima.
6) De acuerdo al pH en el que se observa su mayor actividad.

Las aminopeptidasas están ampliamente distribuidas en bacterias, hongos, plantas y animales. Estas enzimas están localizadas en diferentes compartimientos subcelulares incluyendo el citoplasma, lisosomas y las membranas y también pueden ser secretadas al medio extracelular. De acuerdo con su mecanismo catalítico, la mayoría de las aminopeptidasas son metalo-enzimas o metaloproteasas. Las aminopeptidasas utilizan residuos de aminoácidos conservados para generar un sitio capaz de unirse a uno o dos iones metálicos divalentes tales como Zn^{2+}, Co^{2+} y Mn^{2+} (Taylor, 1993).

Análisis espectroscópicos y cinéticos indican que algunas aminopeptidasas requieren dos iones metálicos para la plena actividad. En otros casos, un único ion es esencial para la actividad enzimática, mientras que el segundo ion modula la actividad enzimática, ya sea positiva o negativamente. Las aminopeptidasas participan en una amplia gama de procesos biológicos. Algunas de ellas actúan como ectoenzimas que pueden participar en la degradación de matrices extracelulares, y algunas actúan como enzimas intracelulares que pueden regular el metabolismo de moléculas bioactivas, incluyendo hormonas y neurotransmisores.

Muchas de las aminopeptidasas juegan importantes funciones en procesos celulares involucrados en la salud y enfermedad, como consecuencia, constituyen blancos para la industria farmacéutica. Muchas de las aplicaciones farmacéuticas están orientadas al diseño de inhibidores específicos de aminopeptidasas. Los inhibidores selectivos de la aminopeptidasa A constituyen potenciales agentes anti-hipertensivos. El diseño de inhibidores de las metionina aminopeptidasas están considerados como potenciales agentes terapéuticos debido al papel de estas enzimas en la angiogénesis y el crecimiento tumoral (Sanz, 2007; Sato, 2004).

1.3.1 Leucin aminopeptidasas

Las leucin aminopeptidasas (LAPs) constituyen un diverso grupo de exopeptidasas que catalizan la hidrolisis de residuos de leucina del amino terminal de proteínas o péptidos. Las LAPs funcionan en una amplia gama de ubicaciones celulares, que determina su disponibilidad de sustrato. Estas enzimas tienen temperaturas, pH óptimo y requerimientos de cationes divalentes variables. Tienen distintas especificidades de substratos que se extienden más allá de la hidrólisis de leucina. Poseen un papel importante en el mantenimiento celular, crecimiento, desarrollo y la defensa celular.

Las LAPs son miembros de la familia M1 o M17 de las peptidasas. Las LAPs de la familia M17 son proteasas con una masa molecular de 320 a 324 kDa con 6 subunidades idénticas de 54 kDa, poseen una estructura hexamérica y requieren la presencia de dos cationes.

La familia M1 no posee una estructura hexamérica y solo requiere un catión. Los iones magnesio o manganeso perecen estar presentes en las LAPs activas, debido a que estos iones son potentes activadores de las LAPs animales, vegetales y microbianas (Matsui y col., 2006).

Las LAPs son inhibidas por agentes quelantes (EDTA Y 1,10-fenantroina), bestatina, amastatina, aminoaldehídos, L-leucinal y leupeptina. Las LAPs mejor caracterizadas son las de *Bos taurus, Escherichia coli* y *Lycopersicon esculentum* (tomate). Los estudios de rayos X han demostrado que existen como homohexámeros, comprendiendo dos trímeros. En muchos de los casos cada monómero une 2 iones Zn^{2+} y forma dos estructuras tipo α y β cuasi-esférica de dominios globulares. Su actividad se puede regular por Mn^{+2}, Mg^{+2}, Co^{+2}, y Ca^{+2} (Matsui y col., 2006; Herrera-Camacho y col., 2007).

A menudo son vistas como enzimas de mantenimiento celular con el rol crítico en el recambio de péptidos. Sin embargo en mamíferos, las enzimas M17 y M1 con actividad LAP contribuyen al procesamiento de péptidos MHC-I para la presentación de antígeno, procesan péptidos bioactivos (oxitocina, vasopresina) y

están involucradas en el tráfico de vesículas a la membrana plasmática (Matsui y col., 2006; Young y col. 2011).

En bacterias, las LAPs de la familia M17 tienen un rol en la proteólisis y también han adquirido la habilidad de unirse al DNA, esta propiedad les permite a las LAPs servir como represores transcripcionales y como mediadores sitio específicos en eventos de recombinación específica en plásmidos y fagos (Matsui y col. 2006).

En plantas, el papel de las LAPs de la familia M17 y las peptidasas relacionadas con la familia M1 de las LAPs ha sido implicado en la defensa, el transporte a la membrana de receptores de auxina y en la meiosis (Matsui y col., 2006).

Se ha descrito una leucin aminopeptidasa M17 que cataliza la renovación de aminoácidos de péptidos generados en el proceso de degradación de la hemoglobina en el parásito *Plasmodium vivax*, se pretenden utilizar inhibidores de este tipo de LAP para así tener una terapia antimalaria (Lee y col., 2010).
Se han realizado estudios donde se observa que la LAP3 es sobreexpresada en el carcinoma de células escamosas esofágicas (ESCC) promoviendo la proliferación celular y la habilidad migratoria de estas células. Los resultados sugieren que la LAP3 no solo se podría convertir en un nuevo biomarcador de pronóstico o diagnóstico, también puede ser una potencial diana molecular para el tratamiento de ESCC (Zhang y col., 2014).

La leucin aminopeptidasa humana puede jugar un papel importante en los eventos tempranos de la infección por VIH y por lo tanto la actividad sérica de esta enzima puede ser útil como un marcador sustituto para la infección por VIH y una respuesta a la quimioterapia (Grembecka y Kafarski, 2001). Estos ejemplos indican que el conocimiento de este grupo de proteínas aportará ventajas en futuras aplicaciones.

1.4 Las levaduras

Las levaduras en el terreno de la investigación, particularmente en Biología Molecular, por ser organismos eucariotas brindan la posibilidad de obtener información que puede ser extrapolada a eucariotas superiores. Son organismos ideales para conocer el papel de la proteólisis en la regulación del metabolismo por su accesibilidad a estudios bioquímicos y genéticos. Además se utilizan como sistemas de expresión de proteínas de interés biotecnológico (Regidor, 2001).

Las levaduras combinan la facilidad, simplicidad y bajo costo de los sistemas de expresión desarrollados de bacterias, con las ventajas de los sistemas de expresión de células animales, mucho más caras y difíciles de desarrollar. Las levaduras son capaces de crecer en medios de cultivo baratos hasta una alta densidad, característica que se combina con el gran número de técnicas desarrolladas para su manipulación genética. A esto debe añadirse que como sistemas de expresión heteróloga suponen un ambiente adecuado para que se den procesos como la maduración post-traduccional y secreción dando lugar a productos idénticos o, en su caso, muy similares a las proteínas nativas. Por otro lado, estos microorganismos son considerados como organismos seguros, debido a su amplio uso en la industria alimentaria (Regidor, 2001).

Saccharomyces cerevisiae es una de las levaduras más empleadas en la producción de proteínas recombinantes. Las técnicas de manipulación genética han sido ampliamente desarrolladas en esta levadura y, además, se posee un amplio conocimiento de su fisiología. Aun así, presenta ciertas limitaciones para la expresión de genes heterólogos como un bajo rendimiento y los procesos de glicosilación de la proteína expresada causan alteraciones en la calidad del producto obtenido.

Dentro del grupo de las llamadas levaduras metilotróficas, se encuentran *Hansenula polymorpha* y *Pichia pastoris.* Estas levaduras retienen todas las ventajas de *S. cerevisiae*, pero constituyen un sistema de expresión más eficiente,

aumentando la cantidad de proteína obtenida. Además el proceso de glicosilación no difiere tanto con el de eucariotas superiores.

Schizosaccharomyces pombe, es una levadura donde las técnicas de biología molecular y de manipulación genética están bien desarrolladas, pero lo más interesante de esta levadura es la gran variedad de procesos celulares que son similares a los que ocurren en mamíferos y, esta característica, la hace idónea para la expresión de proteínas de eucariotas superiores (Regidor, 2001).

1.5 *Schizosaccharomyces pombe*

Schizosaccharomyces pombe fue descrita por primera vez por P. Linder, fue nombrada *"pombe"* por la palabra en Swahili para cerveza, pues esta levadura fue aislada de la cerveza de mijo proveniente del oriente de África en el año 1890. Fue llamada la levadura de fisión, porque solo se reproduce por fisión binaria a diferencia de la levadura de gemación *S. cerevisiae*. *S. pombe* es un ascomiceto genéticamente distante de la levadura de gemación, es un eucariota unicelular con forma cilíndrica de 3-4 µm de diámetro y de 20-25 µm de longitud, pero en condiciones de inanición las células se acortan (figura 4). Las células de *S. pombe* usualmente son cilíndricas con extremos redondeados (Lindner, 1983; Wixon, 2002).

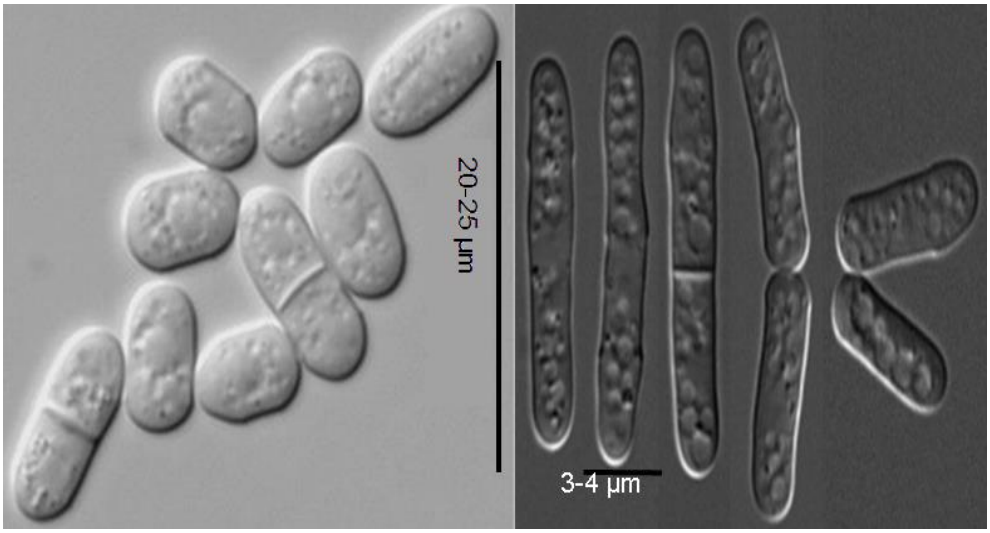


Figura 4. Morfología de *Schisoccharomyces pombe*

S. pombe es el sexto organismo eucariótico cuyo genoma ha sido completamente secuenciado. Seguido de la levadura de gemación *S. cerevisiae*, el nematodo *Caenorhabditis elegans,* la mosca de fruta *Drosophila melanogaste*r, la hierba de mostaza *Arabidopsis thaliana* y el humano (Wixon, 2002).

El tamaño del genoma de *S. pombe* es 13.8 Mb de tamaño y está organizada en tres cromosomas, I (5.7 Mb), II (4.6 Mb) y III (3,5 Mb). Se estima un máximo de 4.940 genes de codificación de proteínas (incluyendo 11 genes mitocondriales) y 33 pseudogenes. Una de las características del genoma de la levadura de fisión es que el 43% de sus genes tienen intrones. Se prevé que su genoma contiene 4.940 genes (Wixon, 2002; Wood y col., 2002).

S. pombe es un organismo haploide que en condiciones favorables crece mediante un ciclo mitótico, siguiendo un ciclo celular eucariota con fase G1, S, G2 y M. Sólo en condiciones de falta de nutrientes, especialmente nitrógeno, se reproducirá sexualmente.
Cuando las células de *S. pombe* detectan un déficit nutricional en el medio empiezan un programa de diferenciación que culminará con la formación de las esporas. Las esporas son las formas de resistencia que permitirán sobrevivir a las condiciones adversas y germinar cuando las condiciones del entorno vuelvan a ser favorables (Malapeira, 2006).

Por otra parte, si el déficit nutricional se produce en una población en la que están presentes los dos tipos sexuales (h^+ y h^-), se iniciará la reproducción sexual. Las células de *S. pombe*, según el tipo sexual, pueden ser h+ o h-. Esta característica viene determinada por el locus *mat1.* En células h+ se expresan en el locus *mat1* dos genes de forma divergente: *mat1-Pc*, el cual controla la diferenciación sexual ("mating type") y *mat1-Pm*, necesario para iniciar la meiosis. En células h- se expresan *mat1-Mc* que controla el "mating type" y *mat1-Mm* imprescindible para entrar en meiosis (Malapeira, 2006).

Dos células de tipo sexual opuesto se reconocerán mediante el sistema de comunicación de las feromonas. A continuación se producirá el “shmooing” consistente en la elongación de las células en dirección a la fuente emisora de feromonas del sexo contrario. Seguidamente las dos células se fusionarán, este proceso conocido como conjugación o “mating” producirá un zigoto (Malapeira, 2006).

El zigoto es diploide y podría mantenerse en un ciclo mitótico diploide si las condiciones del medio mejoran en este punto del ciclo. Los diploides son muy inestables y si las condiciones siguen siendo poco favorables empezarán rápidamente la meiosis la cual culminará con la formación de un asco con cuatro esporas haploides en su interior. Las esporas germinarán y entrarán nuevamente en el ciclo mitótico cuando las condiciones ambientales lo permitan, cerrándose así el ciclo (figura 5).

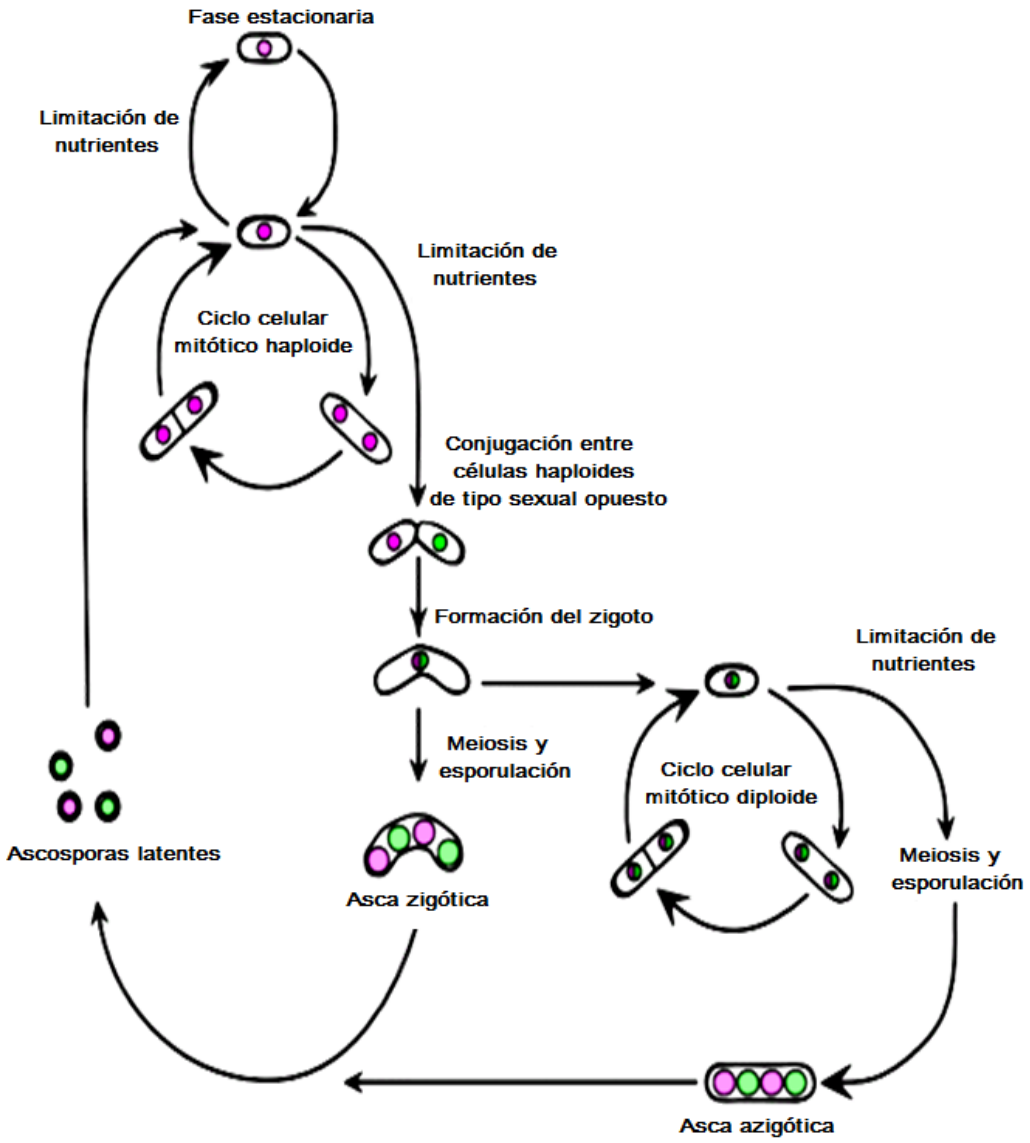


Figura 5. Ciclo celular haploide y diploide de *Schizosaccharomyces pombe* (Malapeira, 2006).

1.5.1 El sistema proteolítico de *Schisoccharomyces pombe*

En la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe*, la información de las peptidasas es limitada; se han descrito solo 8 enzimas intracelulares proteolíticas: dos endoproteinas yspA y yspB, una carboxipeptidasa yspI, una aminopeptidasa yspI, una dipeptidil aminopeptidasa yspI, dos complejos proteolíticos, la peptidasa multicorn y proteosoma 26S y la leucinaminopeptidasa yspII.

Proteinasa yspA

Presenta actividad frente a hemoglobina desnaturalizada con ácido, activada por la incubación de los extractos celulares a pH 5. Cuando se incuban los extractos recién obtenidos no se detecta actividad lo que pone en evidencia la existencia de un inhibidor que se destruye en medio ácido (Suarez y col., 1991).

Proteinasa yspB

Presenta actividad frente azocol, actuando a un pH neutro. Es inhibida por un sustrato endógeno, termoresistente, estable a pH de 5-7 (Suarez y col., 1991).

Carboxipeptidasa yspI

Presenta actividad frente al substrato benzoil-tirosina-4–nitroanilida, inactivándose a pH de 5. Es sintetizada como una pre-proteína (Suarez y col., 1991).

Aminopeptidasa yspI

Los niveles de esta enzima parecen ser regulados en cierta medida por la naturaleza de la fuente de nitrógeno. Su masa molecular relativa es de 184 kDa, siendo un dímero con dos subunidades idénticas. El pH óptimo para la escisión de L-lisina-4-nitroanilida es 7. Los iones de mercurio, EDTA y cloroquina se encontraron como potentes inhibidores de la actividad aminopeptidasa yspI (Arbesú y col., 1993).

Dipeptidil-aminopeptidasa yspI

Presenta actividad aminopeptidasa frente al substrato alanil-L-prolina-4-nitroanilida en extractos crudos a un pH óptimo de 7.5. Es codificada por el gen *dpa1*$^{+}$ (Villa y Suarez, 1994).

Peptidasa multicorn

Complejo citosólico oligomérico que actúa sobre el substrato sintético AAF-MCA con un pH optimo que va de 6.8 a 7.2. Sus inhibidores son PMSF y AAF-CMK, por lo que se considera una serín proteasa (Osmulski y Gaczynska, 1998).

Proteosoma 26S

Presenta tres tipos de actividad proteolítica frente a substratos sintéticos: tipo Quimotripsina, tripsina y peptidil glutamil hidrolasa. Se inhibe por lactacistina y carboxibenzil tri-leucina vinilsulfona (Wilkinson y col., 1999).

1.6 Leucin aminopeptidasa yspII

En 2007, en el laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de CQ-ICUAP, el grupo de Herrera-Camacho puso en evidencia una nueva exopeptidasa: la (LAPyspII), la cual se expresa al inicio de la fase estacionaria, es una peptidasa-básica citoplásmica, actuando sobre sustratos que contienen leucina en el extremo N-terminal a un pH=8.5, y es dependiente de iones Mn^{2+}. Presenta una masa molecular de 320 kDa siendo una proteína hexamérica (6 x 54 kDa). Está codificada por el gen *ape2*+ el cual se localiza sobre el cromosoma I, presenta un marco abierto de lectura de 1542 pb que codifica para una proteína de 513 aminoácidos (Herrera-Camacho y col., 2007).

A partir de las estructuras cristalinas de la LAP de bovino y la LAP de *E. coli* se construyó un modelo *in-silico* de la estructura tridimensional de la LAPyspII en donde en el dominio C-terminal constituido por 347 aminoácidos se encuentra el sitio activo, y se determinó que la Lys292 tiene un papel fundamental en la catálisis (figura 6) (Herrera-Camacho y col., 2007; Rivera, 2009).

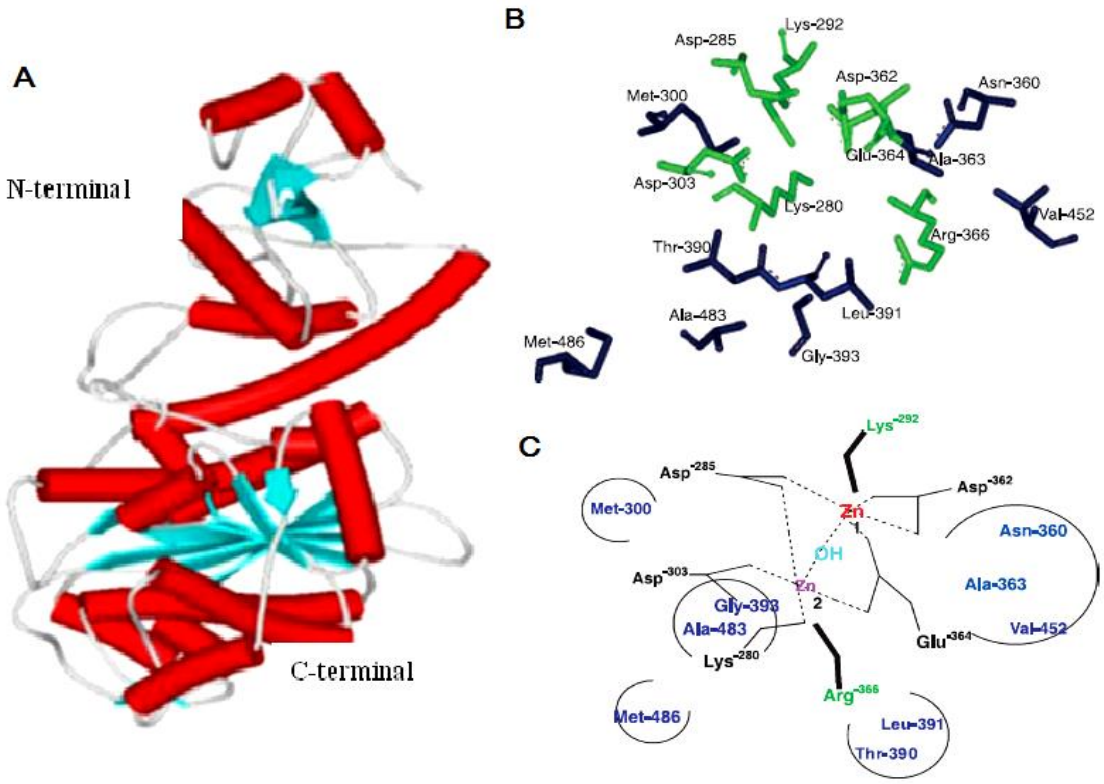


Figura 6. Modelo *in-silico* de la leucin aminopeptidasa yspII.
A) Presencia de los dominios N-terminal y C-terminal, donde se encuentra el sitio activo.
B) Residuos catalíticos (verde), y residuos de la cavidad hidrofóbica (azul) del sitio activo (programa WEB LAB VIEWER). C) Posibles sitios de interacción con Zn^{2+} (o Mn^{2+}) (programa CHEM DRAW PRO). Tomado de Herrera-Camacho y col., 2007 y de Rivera, 2009).

Estudios cinéticos de competición de iones mostraron que la LAPyspII desmetalizada recupera en un 100% su actividad enzimática con Mn^{2+}; sin embargo, en presencia de Zn^{2+} la actividad es nula (Rivera, 2009). Se sabe que la familia de las LAPs tiene 2 sitios de unión a metales, esto sugiere que el Zn^{2+} puede no ser indispensable, pero el Mn^{2+} es fundamental para que la LAPyspII presente actividad específica.

La LAPyspII se sintetiza en la célula en cantidades bajas, una estrategia para obtener cantidades importantes de la enzima es sobreproducirla con vectores de clonación. En trabajos precedentes en el laboratorio se construyeron vectores de clonación teniendo el ORF del gen *ape2*$^{+}$ en un vector de sobreexpresión (vector

pRSPLAPII), también se obtuvo un vector con el gen *ape2*+ adicionado con tripletes que codifican para un motivo de 6 histidinas en el extremo N-terminal (vector pRSPLAPII-H) (Cruz, 2006; López, 2010). Los vectores se muestran en la figura 7.

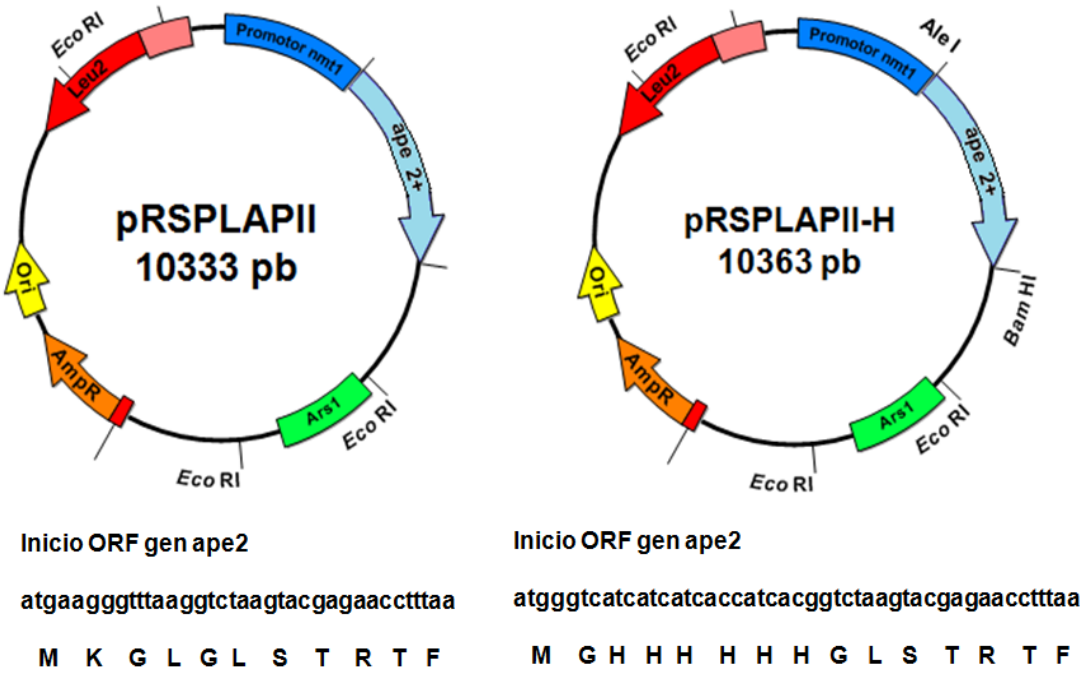


Figura 7. Vectores pRSPLAPII y pRSPLAPII-H.

El vector pRSPLAPII-H cuenta con 10363 pb, posee la secuencia autónoma de replicación de levadura ARS1, el marcador de selección LEU2, el promotor negativo de tiamina (nmt1) y en la región de múltiple clonación se encuentra insertado el ORF del gen *ape2*+ adicionado con 6 tripletes que codificaran para 6 histidinas en el extremo N-terminal de la proteína.

En trabajos precedentes en el laboratorio observaron que la LApyspII con y sin el motivo de 6 histidinas presentan la misma actividad enzimática, por lo que se trabajó con la LApyspII-H ya que el motivo de histidinas es importante para la purificación de la enzima por cromatografía de afinidad con metales inmovilizados, obteniendo condiciones de sobreexpresión y purificación parcial de la LApyspII (López, 2012).

2. JUSTIFICACIÓN

Diversos estudios realizados han revelado que las LAPs pueden tener funciones diferentes a las descritas en la proteólisis, por lo cual es importante conocer la función de la LAPyspII. En trabajos precedentes en el laboratorio se obtuvieron cepas mutantes de *S. pombe* por deleción del gen ape2+, se observó una velocidad de crecimiento disminuida de la cepa mutante con respecto a la cepa original por lo que se ha propuesto que la LAPyspII tiene un papel importante en procesos de división celular.

Para continuar con los estudios de la función, estructura molecular y el mecanismo de la actividad enzimática de la LAPyspII, se requiere determinar qué iones forman parte de su estructura y cuantificarlos. Para esto se necesita a la enzima purificada en cantidades importantes. La LAPyspII se sintetiza en la célula de forma regulada y en cantidades bajas, por lo que una estrategia para obtener concentraciones importantes de enzima es sobreproducirla con vectores de clonación, por lo que una estrategia para obtener cantidades importantes de enzima será sobreproducirla con vectores de clonación, los cuales ya fueron construidos en trabajos precedentes por Cruz, 2006 y López, 2010.

A partir de la obtención de cantidades importantes de enzima purificada a homogeneidad se podría en un futuro determinar y cuantificar el o los metales presentes en la estructura molecular de la LAPyspII y definir el mecanismo de reacción enzimática.

En el presente trabajo se propuso obtener cepas de *S. pombe* sobreproductoras de LAPyspII, buscar las mejores condiciones para la sobreproducción de la LAPyspII, así como las mejores condiciones para obtener la enzima purificada a homogeneidad.

3. OBJETIVOS

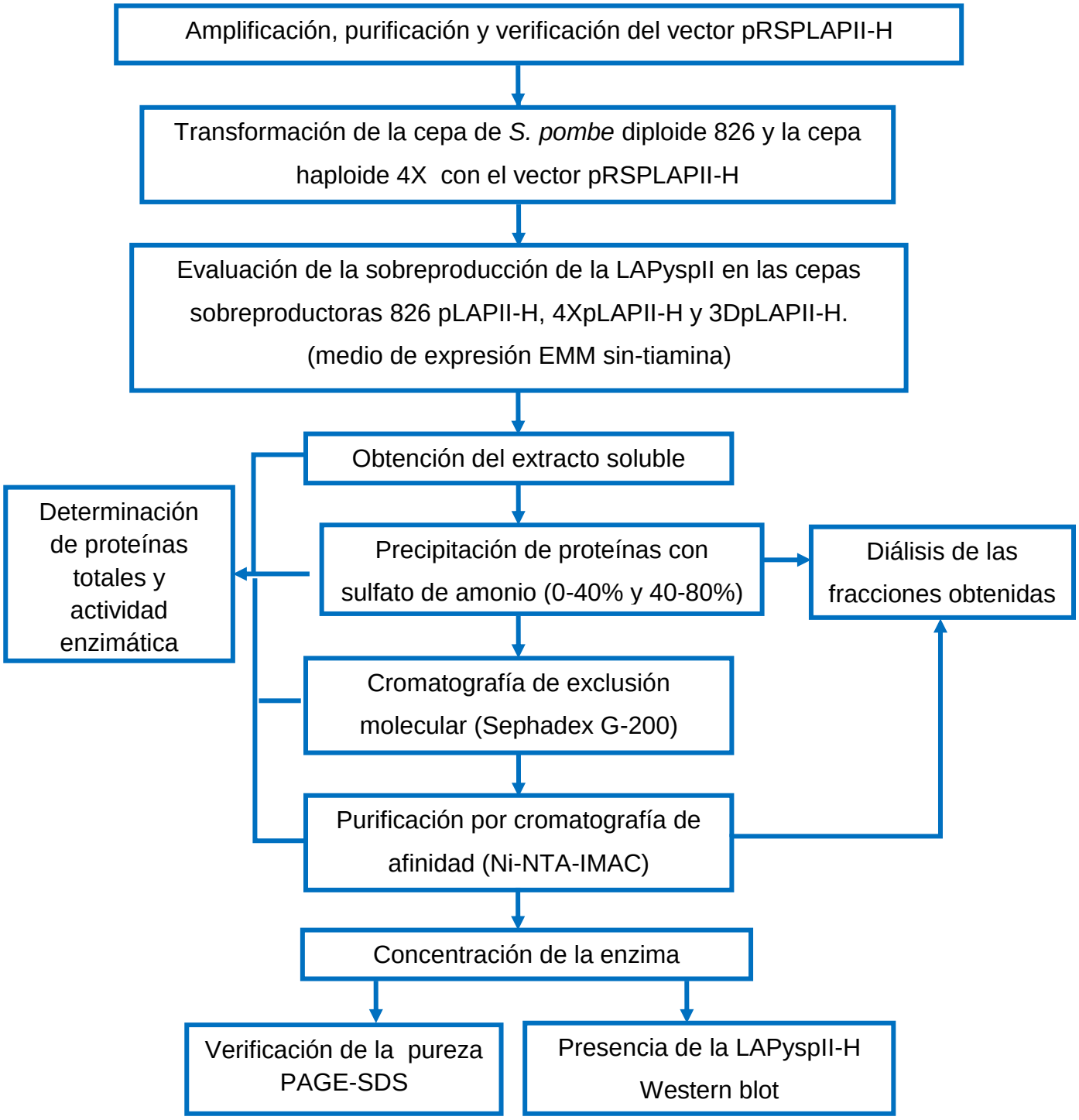
3.1 Objetivo general

- Obtener cepas de *Schizosaccharomyces pombe* sobreproductoras de la LAPyspII, sobreproducir la LAPyspII y purificar por cromatografía de afinidad con metales inmovilizados.

3.2 Objetivos particulares:

- Amplificar y purificar el vector pRSPLAPII-H de la cepa de *E. coli* transformada con este plásmido. Verificar la construcción del vector con enzimas de restricción.
- Obtener cepas haploides y diploides sobreproductoras de la LAPyspII-H por transformación con el vector de clonación pRSPLAPII-H.
- Determinar las mejores condiciones para la sobreproducción de la LAPyspII.
- Purificar la LAPyspII-H mediante precipitación con sulfato de amonio, cromatografía de exclusión molecular y cromatografía de afinidad con metales inmovilizados (IMAC).

4. ESQUEMA DE TRABAJO



5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Material biológico

Se utilizaron cepas de la levadura *S. pombe*, así como una cepa de *E.coli,* donde se encuentra resguardado el vector recombinante pRSPLAPII-H. La tabla 2 muestra el genotipo y la procedencia de cada cepa.

Tabla 2. Cepas utilizadas.

Cepa	**Genotipo**	**Procedencia**
E. coli One Shot® TOP10	F^- *mcr*A Δ(*mrr-hsd*RMS-*mcr*BC) φ80*lac*ZΔM15 Δ*lac*X74 *rec*A1 *ara*D139 Δ(*ara-leu*)7697 *gal*U *gal*K *rps*L (Str^R) *end*A1 *nup*G λ-	Invitrogen
S. pombe 972	h^-	ATCC
S. pombe 826	h^+/h^+ *leu1-32/ leu1-32, ade6-M210/ade6-M210, ura4-D18/ura4-D18*	ATCC
S. pombe 201399 ***(4X)***	h^+ *ura4-D18, leu1-32, ade6-M210, his7-366*	ATCC
S. pombe 3D	h^+ *ura4-D18, leu1-32, ade6-250, ape1$^-$, dpa1$^-$*	**Villa L y Suárez-Rendueles, 1994.**

5.2 Material y reactivos

Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico obtenidos de proveedores como SIGMA, ALDRICH, PROMEGA, INVITROGEN y BIO-RAD.

5.3 Métodos

Los métodos utilizados en el presente trabajo fueron tomados de trabajos precedentes en el laboratorio (Herrera-Camacho, 2007; Rivera, 2009; López, 2012). Tabla 3.

Tabla 3.

Determinación	**Técnica**	**Referencia**
Proteínas totales	Sedmak y Grossberg modificado	Sedmak y Grossberg 1976
Actividad enzimática	Frey y Rohm modificado	Herrera-Camacho 2007

5.4 Soluciones y medios de cultivo

La composición de las soluciones y medios de cultivo empleados en este trabajo se muestran en el anexo 1.

5.5 Amplificación y purificación del vector pRSPLAPII-H

Se utilizó el protocolo del kit Maxiprep. Se inoculó un precultivo de 2.5 mL en LB-ampicilina de *E. coli* transformada con el vector pRSPLAPII-H y se dejó crecer toda la noche. A partir del precultivo se inocularon 50 mL de LB, creciéndolo hasta turbidez completa. Las células se centrifugaron a 3600 rpm 5 minutos, eliminando el sobrenadante. El pellet se resuspendió en 5 mL de la Solución I (anexo 1). Se agregaron 10 mL de la solución II (anexo 1) y se mezcló, se adicionaron 7.5 mL de la solución III (anexo 1) y se mezcló. Se transfirió a hielo durante 10 minutos (se forma un precipitado blanco floculante que corresponde al ADN cromosomal, proteína, RNA de alto peso molecular y membrana), se agitó en vórtex. Se centrifugó 4000 rpm, 15 minutos a 4 °C. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se filtró con papel filtro. En seguida se añadieron 0.6 volúmenes de isopropanol, se mezcló y se guardó el tubo 10 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó 5000 rpm, 15 minutos a temperatura ambiente. Se eliminó el sobrenadante cuidadosamente y se esperó hasta secar. El precipitado se disolvió en 200 µL de agua estéril y se transfirió a un tubo eppendorf.

Se agregaron 5 µL de ARNasa y se incubó 20 minutos a 37 °C. Se adicionó 1 volumen de fenol: cloroformo: isopropanol y se agitó en vórtex. Se centrifugó 12000 rpm, 10 minutos. Se recuperó el sobrenadante, se adicionó 1 volumen de cloroformo y se agitó en vórtex. Se centrifugó 12000 rpm, 10 minutos. Se recuperó el sobrenadante, se adicionaron 2.5 volúmenes de isopropanol y se dejó a -20 °C durante 1 hora. Se centrifugó 12000 rpm, 10 minutos, se desechó el sobrenadante y se dejó secar. Finalmente el precipitado se resuspendió en 30 µL de agua estéril y se guarda a -20 °C.

Para comprobar la pureza y tamaño del vector se realizó una electroforesis en un gel de agarosa 0.7% en TBE 1X y bromuro de etidio 0.01%, el gel se corrió a 100 volts en buffer TBE 1X (anexo 1) por 35 minutos.

Para cuantificar la cantidad de ADN plasmídico se realizó una dilución 1/100 de la muestra y se midió con celda de cuarzo a una longitud de onda de 260 nm. Utilizando la siguiente formula se obtuvo la concentración:

$$Concentración\ \left(\mu\frac{g}{mL}\right) = Abs\ 260\ nm * factor\ de\ dilución * 50\ \mu g/mL$$

5.6 Digestiones del vector pRSPLAPII-H

Se utilizaron las enzimas de restricción AleI y BamHI bajo las siguientes condiciones que presenta la tabla 4.

Tabla 4. Condiciones a las que se realizaron las digestiones

Reactivo	volumen (µL)	volumen (µL)	volumen (µL)
Buffer 10X	2	2	2
AleI	2	-	2
BamHI	-	2	2
ADN (pRSPLAPII-H)	15 (110 µg)	15 (110 µg)	14 (102 µg)
Agua	1	1	-
Vol. total	20	20	20

La reacción se incubó a 37 °C toda la noche.

Se realizó una electroforesis de las muestras digeridas en un gel de agarosa 0.7% en TBE 1X y bromuro de etidio 0.01%, el gel se corrió a 100 volts en buffer TBE 1X por 35 minutos.

5.7 Transformación de levaduras con el vector pRSPLAPII-H (cepas 826 y 4X de *S. pombe*)

Se inoculó un precultivo de 3 mL en YNB de las cepas 826 y 4X. Partiendo del precultivo se inoculan 10 mL de YE hasta alcanzar una $D.O._{600nm}$ 2 (aproximadamente 16 horas). Las células se centrifugaron 4000 rpm por 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió en 5 mL de TE estéril pH 7.5 (anexo 1). Se centrifugó 4000 rpm 5 minutos y se eliminó el sobrenadante. El paquete celular se resuspendió en 4 mL de acetato de litio 1 M (acetato preparado en TE estéril). Se incubó 30 °C una hora con una agitación moderada (130 rpm). Se centrifugó 4000 rpm 5 minutos y se eliminó el sobrenadante. Se resuspendió el paquete celular en 200 µL de acetato de litio 1 M y se transfirió a un tubo eppendorf. Se añadieron 30 µL de ADN plasmídico (pRSPLAPII-H) y se mezcló suavemente. Se incubó a 30 °C, 10 minutos sin agitación. Se agregó 1 mL de PEG-4000 al 50% y se mezcló suavemente hasta homogeneizar. Se incubó a 30 °C, 1 hora sin agitación.

Se aplicó un choque térmico, 5 minutos a 42 °C en baño maría. Se centrifugó 5000 rpm, 30 segundos. Se eliminó el sobrenadante y se lavó sin resuspender el pellet con 1 mL de sorbitol 0.8 M, eliminando posteriormente el sorbitol. Se agregaron 200 µL de sorbitol y se resuspendió el paquete celular lentamente. Las células se agregaron a placas de agar YNB con Ade y Ura (anexo 1) y se sembraron por plaqueo. Se sembraron dos placas una con 130 µL y otra con 50 µL de la suspensión celular. Se incubaron de 3-5 días hasta observar las transformantes.

5.8 Sobreexpresión de la LAPyspII-H (cepa sobreproductora 3DpLAPII-H)

Se realizó un precultivo de la cepa sobreproductora de *S. pombe* 3DpLAPII-H en 30 mL de YNB con adenina y uracilo, se creció con agitación constante (180 rpm) durante 21 horas, hasta alcanzar una $D.O._{600nm}$ 4-6. A partir del precultivo se inocularon 5 matraces de 40 mL con medio ET con una concentración de tiamina 2 µM, ajustándolos a una $D.O._{600nm}$ inicial 0.5 y se crecieron con agitación constante

(180 rpm) durante 10 horas, hasta alcanzar una $D.O._{600nm}$ 2. Finalmente se lavaron las células dos veces con agua estéril y se inocularon en 5 matraces con 400 mL de medio EMM, ajustándolos a una $D.O._{600nm}$ inicial 0.2 y se crecieron con agitación constante (180 rpm) hasta alcanzar una $D.O._{600nm}$ 2 (aproximadamente 16-18 horas).

5.9 Obtención del extracto soluble

Los cultivos anteriores se centrifugaron 6000 rpm, 10 minutos a 4 °C. Se lavaron las células 2 veces con agua estéril y se centrifugaron 6000 rpm 10 minutos a 4 °C. Antes de la última centrifugación, se pesó un tubo vacío y después de la centrifugación se pesó el tubo con células para calcular los gramos de peso húmedo obtenidos. El pellet de células se resuspendió en 0.65 mg de zimoliasa/1.5 mL de buffer de zimoliasa (anexo 1) por gramo de peso húmedo de células. Se incubó 30 minutos a 37°C. Se centrifugó 4000 rpm, 10 minutos a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 2.5 mL de buffer Tris/HCl 5 mM pH 8 por cada gramo de peso húmedo de células. Se agregó el inhibidor de proteasas PMSF en una concentración final 1 mM. Se adicionaron 5 gramos de perlas de vidrio 5 mm de diámetro por cada gramo de peso húmedo de células. La ruptura celular se llevó a cabo de manera mecánica utilizando el equipo BEAD-BEATER durante 45 minutos a 4 °C. Se verificó la ruptura al microscopio. Para separar las perlas del extracto crudo celular se filtró al vacío usando un embudo con placa filtrante, adicionando dos volúmenes más de buffer Tris/HCl 5 mM pH 8. Se centrifugó 10 000 rpm, 30 minutos a 4 °C, se separó el sobrenadante. Se centrifugó 10 000 rpm, 20 minutos a 4 °C y se separó el sobrenadante. Finalmente se realizó la ultracentrifugación a 32000 rpm por 1 hora a 4 °C. Se retiraron los lípidos de la superficie con una pipeta Pasteur por succión con una bomba de vacío y se separó el sobrenadante obteniendo así el extracto enzimático soluble. Se separaron 500 µL y se guardaron a -20 °C para la determinación de proteínas totales y actividad enzimática. El resto del extracto enzimático se utilizó para la precipitación con sulfato de amonio.

5.10 Precipitación con sulfato de amonio

La precipitación con sulfato de amonio es una técnica en donde se logra la precipitación de una fracción de proteínas mediante el aumento de la fuerza iónica del medio. Grandes cantidades de una sal agregada a una solución de proteínas, disminuye la interacción proteína-H_2O porque quita la capa de solvatación, predominando la interacción proteína-proteína y generando la precipitación de las mismas. La concentración salina a la que se produce la precipitación no es igual para todas las proteínas, lo que permite usar ésta propiedad para la separación y purificación de proteínas particulares a partir de mezclas complejas. El sulfato de amonio posee una gran solubilidad y el ion sulfato divalente permite alcanzar altas fuerzas iónicas. La adición gradual de ésta sal permite el fraccionamiento de una mezcla de proteínas, las cuales son precipitadas pero no desnaturalizadas.

Para la precipitación con sulfato de amonio se colocó el extracto soluble en un vaso de precipitado dentro de un baño de hielo y con agitación suave. Se adicionó el sulfato de amonio en pequeñas cantidades correspondientes al 40% de saturación (226 g/L). La disolución permaneció a 4 °C con agitación cada 5 minutos, durante 30 minutos. Se centrifugó 10000 rpm 15 minutos a 4 °C. El sobrenadante se colocó nuevamente en un vaso de precipitado dentro de un baño de hielo y se le agregó la cantidad necesaria para llegar al 80% de saturación con la sal (258 g/L), la disolución permaneció a 4 °C con agitación cada 5 minutos, durante 30 minutos. Se centrifugó 10000 rpm 15 minutos a 4 °C. Los dos precipitados de cada concentración de sal (0-40% y 40-80%) se resuspendieron en 6 mL de buffer 20mM Tris/HCl pH 8. Posteriormente se dializaron en una membrana de celulosa durante 16 horas a 4 °C con agitación constante en una solución amortiguadora 20 mM Tris/HCl pH 8. Se separaron 500 µL de cada precipitación para la determinación de proteínas totales y actividad enzimática.

5.11 Cromatografía de exclusión molecular Sephadex G-200

La cromatografía de exclusión molecular separa proteínas y otras macromoléculas biológicas de acuerdo a sus masas moleculares. La separación se lleva a cabo por el flujo de la muestra proteica a través de partículas de gel porosas no cargadas. El soporte inerte es Sephadex G-200, polisacárido dextrán modificado químicamente y entrecruzado con epiclorhidrina, con diámetro de esfera de 10-40 µm y un rango de fraccionamiento de pesos moleculares de 20 a 400 kDa. Las proteínas eluyen de la columna en orden decreciente a su masa molecular.

Todas las soluciones y la muestra enzimática fueron filtradas por un tamaño de poro 0.22 µm. Todo el proceso cromatográfico se lleva en un cuarto frio a 4 °C.

La columna con un volumen de resina de 240 mL (46 cm de altura x 2.6 cm de diametro) se equilibró con una solución amortiguadora 20 mM Tris/HCl pH 8, 0.1 M KCl y 0.01% de azida de sodio como agente antimicrobiano, a una velocidad de flujo 12 ml/hr. La muestra que contiene las proteínas que precipitaron de 40-80% se le adicionó KCl 0.1 M y 0.2 M de sorbitol para hacer más densa la solución, fue cargada en la columna. Se realizó la elución con buffer Tris/HCl 20 mM pH 8, KCl 0.1 M y azida de sodio 0.01%. Se colectaron fracciones de 2.5 mL por tubo con la ayuda de un colector de fracciones. A cada tubo se le determinó actividad enzimática y proteínas (las proteínas se leen a una longitud de onda de 280 nm). Las fracciones con mayor actividad se colectaron (25 ml) y se concentró la muestra con Aquacide a un volumen final de 2 mL.

5.12 Cromatografía de afinidad IMAC Ni-NTA

El procedimiento de purificación se hizo bajo condiciones nativas (anexo 2). Se preparó una columna de 10 cm con 3 mL de resina Ni-NTA (Invitrogen) equilibrada con buffer de unión (anexo 2).

Se tomaron 25 mL de muestra y se concentraron a un volumen final de 2 mL, obteniendo así un concentrado para ponerlo en el buffer de unión para la columna con Ni-NTA.

La purificación se llevó a cabo equilibrando previamente 1.5 mL de resina en una columna de 10 mL con buffer de unión, en agitación lenta durante una hora a 4 °C. La muestra concentrada fue llevada hasta un volumen final de 10 mL con el buffer de unión, separando 500 µL para su posterior diálisis y determinación de proteínas totales y actividad enzimática. Por lo tanto se agregaron a la columna 9.5 mL de muestra, se mantuvieron en suspensión la muestra y la resina durante 2 horas con agitación suave a 4 °C. Una vez concluido el tiempo se adaptó una bomba peristáltica de flujo a la columna y se eluyó la fracción no pegada, se realizaron dos series de lavados, la primera con el buffer de lavado (anexo 2) y la segunda con buffer de lavado con alta concentración de NaCl (anexo 2). Finalmente se agregó el buffer de elución (anexo 2). Se recolectaron fracciones de 3 mL a un flujo constante de 0.2 mL/min. Para cada fracción recolectada se midieron las proteínas (por absorbancia a 280 nm). Las fracciones del no pegado, lavados y eluciones se unieron y se determinó actividad enzimática y proteínas totales para estas tres muestras.

5.13 Determinación de proteínas totales

Se empleó el método de Sedmark y Grossberg con una sensibilidad de 1-10 µg. Se utilizó azul brillante de Coomasie G que reacciona con las proteínas presentes en la muestra. Para la determinación de proteínas en cada muestra se realizó una curva de calibración con albúmina bovina. La cantidad de proteínas de cada muestra se obtiene interpolando el valor de absorbancia leída a 620 nm en la gráfica de la curva patrón de albúmina.

Las muestras y la curva se prepararon como indica la tabla 5. La curva de calibración de albúmina se muestra en el anexo 3.

Tabla 5. Preparación de la curva de albúmina y muestras.			
Tubo	**Albumina 0.1 mg/mL (µL)**	**H2O estéril (µL)**	**Solución Azul de Coomasie (µL)**
Testigo	---	500	500
1	20	480	500
2	60	440	500
3	100	400	500
4	140	360	500
5	180	320	500
Tubo (s)	**Muestra (s) (µL)**	**Completar a 500 µL**	**Solución Azul de Coomasie (µL)**
Extracto soluble	50 (dilución 1/10)	450	500
Precipitación 0-40%	50	450	500
Precipitación 40-80%	50 (dilución 1/20)	450	500
Elución Sephadex G-200	50	450	500
Muestra IMAC Ni-NTA	50	450	500
No pegado	200	300	500
Lavados	200	300	500
Elución	400	100	500

5.14 Determinación de actividad enzimática

Se llevó a cabo mediante el método de Frey y Rohm, modificado por Herrera y col. 2007, la actividad de la LAPyspII se midió haciendo uso de un sustrato cromóforo unido por un enlace peptídico a la leucina (Leucina-pNA). La mezcla de reacción se preparó de la siguiente manera:

En un volumen final de 500 µL

- 225 µL H_2O estéril
- 125 µL Tris/HCl 200 mM pH 8.5
- 50 µL $MnCl_2$ 10 mM
- 50 µL muestra
- 50 µL sustrato Leu-pNA 10 mM

Para el tubo control: lo mismo pero en lugar de la muestra se colocaron 50 µL de buffer Tris/HCl 20 mM pH 8.5

La enzima se pre-incubó en dicha mezcla (sin el sustrato) durante diez minutos a una temperatura de 37 °C, posteriormente se adicionó el sustrato Leu-pNA para llevar a cabo la reacción. Al término de la reacción se adicionaron 500 µL de una mezcla de paro compuesta por 40 mM de EDTA pH 8 y 20 mM de cloroquina, se agitó vigorosamente y se dejó a 4 °C, 10 minutos. La hidrólisis del sustrato liberó p-nitroanilida ocasionando un cambio a una coloración amarilla, el cual se midió a una absorbancia de 405 nm.

Una unidad enzimática se define como la cantidad de enzima que produce la transformación de 1 nanomol de sustrato (Leu-pNA) por minuto bajo las condiciones antes citadas.

Para establecer las unidades enzimáticas se utiliza la siguiente fórmula:

$$mU\left(\frac{nmol}{min}\right) = \frac{Abs}{t.\in.l.}\ x\ 0.001\ x\ 10^9$$

Donde:

Abs= absorbancia a 405 nm
t= tiempo de reacción en minutos
E= coeficiente de extinción molar de la pNA que corresponde a 9900 cm^{-1} M^{-1}
0.001 = volumen final al cual se mide la absorbancia (L)
10^9 = factor de conversión de moles a nanomoles
l = paso de la luz de la celda (1 cm)

La actividad específica se refiere al número de unidades enzimáticas en relación con la cantidad de proteína en mg, es decir, corresponderá al número de miliunidades de actividad enzimática por mg de proteína.

$$Actividad\ específica\ (nmol/min/mg) = \frac{mU}{mg\ de\ proteína}$$

5.15 Precipitación de proteínas con acetona

La precipitación de proteínas con acetona permite poner una cantidad importante de proteínas en volúmenes pequeños para cargar los geles.

Se precipitaron 25 µg de proteínas de cada muestra. Se toma el volumen necesario que contenga 25 µg de proteína, se añadieron 9 volúmenes de acetona por un volumen de muestra en un tubo eppendorf. Se dejó incubando durante 2 horas a -20 °C (moviendo el tubo cada 30 minutos). Se centrifugó 10000 rpm 10 minutos a 4 °C. Se retiró la acetona y se dejó secar el precipitado. La proteína se resuspendió en 10 µL de buffer de carga (1X) para proteínas. Las muestras se incubaron durante 5 minutos en agua hirviendo. Se cargaron 10 µL en cada gel (PAGE-SDS, Western blot).

5.16 Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes PAGE-SDS

La electroforesis es condiciones desnaturalizantes en una técnica ampliamente utilizada en bioquímica que permite separar moléculas cargadas en una mezcla bajo la influencia de la aplicación de un campo eléctrico. La movilidad de las proteínas está en función a su masa molecular y del tamaño del poro del gel empleado en la separación.

Se utilizó un equipo Mini Protean de Bio Rad, se adicionaron 4 mL de gel de corrimiento (anexo 4) y se pone en la superficie con mucho cuidado 500 µL de metanol, una vez polimerizado el gel se retiró el metanol y se adicionaron 1.5 mL de gel de concentrado (anexo 4), se colocó un peine de 10 pozos y tras la polimerización del gel de concentrado se retiró el peine. Se montó la cámara electroforética, se adicionó buffer de corrida 1X (anexo 4) y se cargaron 10 µL de cada muestra. El gel de concentrado se corrió a 70 volts y el gel de corrida a 100 volts. La electroforesis de detuvo cuando el frente de migración llegó al final del gel.

Se retiró el gel de la cámara y se prosiguió a la tinción con azul de Coomasie R-250 y al Western blot.

5.17 Tinción con azul de Coomasie

Para la tinción se utilizó una solución de azul de Coomasie R-250 0.05%, ácido acético 10% y metanol 50% en agitación suave durante una hora. El exceso de colorante se eliminó con una solución de ácido acético 10%, metanol 50% en agitación suave durante 30 minutos hasta la visualización de las bandas. Se retiró la solución de desteñido y el gel se conservó en agua estéril.

5.18 Inmunoblotting. Western blot

La técnica de inmunoblotting nos provee de información acerca de la identidad de las proteínas, al ser transferidas a membranas de nitrocelulosa o PVDF, donde estarán accesibles para interaccionar con otras moléculas (anticuerpos) que nos permiten su identificación. Las proteínas quedan unidas a estas membranas de manera no covalente por interacciones electroestáticas e hidrofóbicas. De esta forma se determina una proteína específica simultáneamente por su antigenicidad y su masa molecular.

La transferencia se realizó de forma semi-seca como se indica a continuación:

Se cortó la membrana del tamaño del gel, se marcó la parte lisa donde se transferirá la proteína. Se sumergió la membrana en metanol 30 segundos con agitación manual. Se lavó con agitación constante con agua 5 minutos y 10 minutos en TT frío (anexo 4). El gel se colocó en TT frío en agitación constante hasta su uso y se mojaron por capilaridad 6 papeles filtro en TT frío.

Se colocaron en la plancha del equipo de transferencia (BIO-RAD) 3 filtros sacando las burbujas con un tubo de vidrio. Con una pinza se puso la membrana sin dejar burbujas. Se colocó el gel sobre la membrana sin dejar burbujas para finalmente colocar 3 filtros más y se pasó un tubo de vidrio para sacar las burbujas. Se cerró el equipo y se fijaron las siguientes condiciones de transferencia: Voltaje: 24 volts, límite de amperaje: 0.3, tiempo: 50 minutos. Al terminar la transferencia se lavó la membrana 10 minutos en agua con agitación constante y 10 minutos en TBS-tween (anexo 4).

En seguida se colocó la membrana en una solución TBS-tween con 5% de leche descremada, dejándola toda la noche a 4 °C en un recipiente tapado. Finalmente se lavó la membrana 3 veces con TBS-tween por periodos de 10 minutos con agitación. Una vez lavada la membrana se incubó en 6 mL de TBS-tween con 3 µL de anticuerpo anti-histidina p29 (anti-His6X) durante 4 horas, se retiró el exceso de anticuerpo lavando en TBS-tween 10 minutos. Se incubó con el segundo anticuerpo S1 (anti-ratón acoplado a la peroxidasa) por 2 horas. Se retiró el

exceso de anticuerpo lavando la membrana 3 veces con TBS-tween por periodos de 10 minutos con agitación, quedando la membrana lista para revelar.

Nota opcional: para ver si las proteínas se transfirieron a la membrana, se puede teñir con rojo de Ponceau (0.5% Rojo de Ponceau y 1% ácido acético). Después de la transferencia lavar la membrana 10 minutos con agua estéril, recubrir la membrana con la solución RP por 30 segundos y lavar después con agua hasta observar las proteínas. Después hay que desteñir las proteínas, lavando la membrana con agua hasta que desaparezca el colorante y proseguir con los lavados, para el tratamiento con los anticuerpos.

5.19 Revelado con luminol (quimioluminiscencia)

El revelado se realizó en el cuarto oscuro, con pinzas se colocó la membrana sobre un acetato, en un tubo eppendorf se colocaron 250 µL de peroxidasa y 250 µL de luminol, se mezclaron y se cubrió la membrana con esta mezcla, se esperó hasta observar luminiscencia y se colocó un acetato sobre la membrana. En seguida, se expuso la membrana con una película autorradiográfica en casette durante 10 segundos y posteriormente se colocó en la solución de revelado (anexo 4) durante 10 segundos con agitación manual, se lavó con agua destilada estéril por 20 segundos con agitación manual y se colocó en una solución de ácido acético 0.03% se lavó con agua destilada estéril por 20 segundos con agitación manual, finalmente se colocó en la solución de fijado (anexo 4) y se lavó con agua destilada estéril por 20 segundos con agitación manual. Las placas autorradiográficas se dejaron secar toda la noche.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En trabajos precedentes de construyeron vectores de clonación teniendo el ORF del gen *ape2*$^{+}$ en un vector de sobreexpresión (pRSPLAPII), así como un vector con el gen *ape2*$^{+}$ adicionado con tripletes que codifican para un motivo de 6 histidinas en el extremo N-terminal (pRSPLAPII-H), mostrados previamente en la figura 7. Con este último vector iniciamos el presente trabajo.

6.1 Purificación y verificación de la construcción del vector pRSPLAPII-H

Para realizar la trasformación de las cepa diploide 826 y la cepa haploide 4X de *S. pombe* se amplificó y purificó el vector pRSPLAPII-H de la cepa transformada de *E. coli* con dicho vector, obteniendo una concentración de 7 µg/µL. Para confirmar que el vector fuera el correcto se realizaron las digestiones con las enzimas de restricción AleI, BamHI y la doble digestión AleI/BamHI.

La figura 8 muestra los corrimientos electroforéticos de la purificación y de los patrones de restricción del vector pRSPLAPII-H. La imagen A muestra en el carril 1 el marcador de peso molecular 1Kb, en el carril 2 se observa una banda ancha de alrededor de 10363 pb que corresponde al vector puro pRSPLAPII-H sin digerir

En la imagen B se observa en el carril 1 el marcador de peso molecular 1 Kb, el carril 2 contiene la banda ancha de más de 10000 pb que es el vector sin digerir, el carril 3 corresponde a la digestión con AleI que lineariza el vector teniendo la banda a 10363 pb, en el carril 4 se observa la digestión con BamHI que también lineariza el vector por lo que se observa la banda también de 10363 pb, el carril 5 muestra la doble digestión con AleI/BamHI que libera el ORF del gen *ape2*$^{+}$ con un tamaño de 1547 pb y el resto del vector con un tamaño de 8816 pb, lo que concuerda con lo reportado por López (2010).

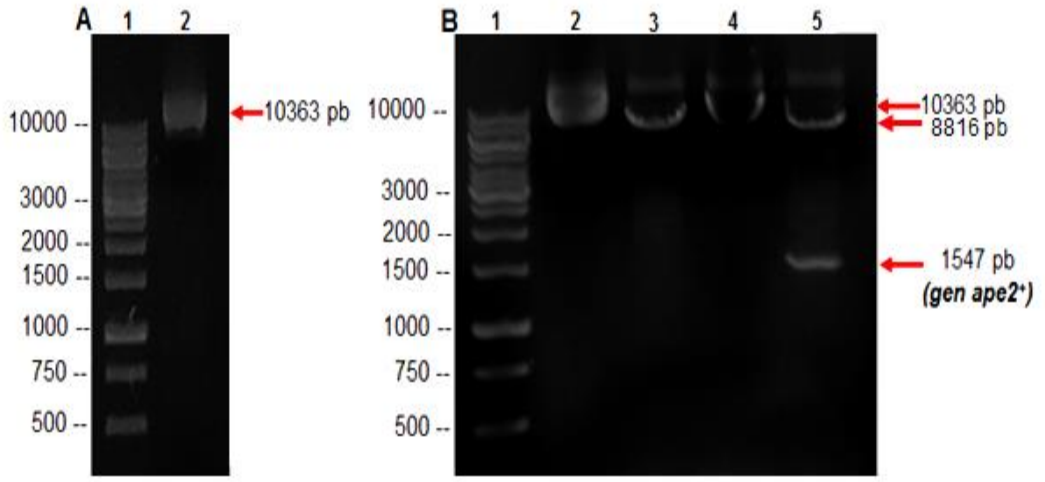


Figura 8. Vector pRSPLAPII-H: corrimientos electroforético de geles de agarosa. Los valores de las bandas fueron tomados de la digestión teórica utilizando el programa NEBcutter V2. (http://tools.neb.comNEBcutter2/).

A) Purificación del vector pRSPLAPII-H. Carril 1: marcador de peso molecular 1 Kb. Carril 2: vector puro (10363 pb).
B) Digestiones del vector pRSPLAPII-H. Carril 1: marcador de peso molecular 1 Kb. Carril 2: vector sin digerir (10363 pb). Carril 3: digestión con AleI (10363 pb). Carril 4: digestión con BamHI (10363 pb). Carril 5: doble digestión AleI/BamHI.

6.2 Obtención de las cepas de *S. pombe* sobreproductoras de la LAPyspII-H (cepa diploide 826 y cepa haploide 4X)

Una vez confirmada la construcción del vector pRSPLAPII-H se procedió a transformar la cepa de *S. pombe* diploide 826 que posee auxotrofías para adenina, leucina y uracilo y la cepa haploide 4X que posee auxotrofías para adenina, leucina, histidina y uracilo. Las células transformadas se sembraron en placas de agar YNB con todos los requerimientos de cada cepa excepto leucina, puesto que el vector pRSPLAPII-H posee el gen *LEU2* utilizado como marcador de selección. Como control negativo se utilizaron células sin transformar de ambas cepas y se sembraron bajo las mismas condiciones.

En la figura 9 se observan las colonias transformadas de la cepa diploide 826 (imagen B), el control negativo no presenta crecimiento (imagen A).

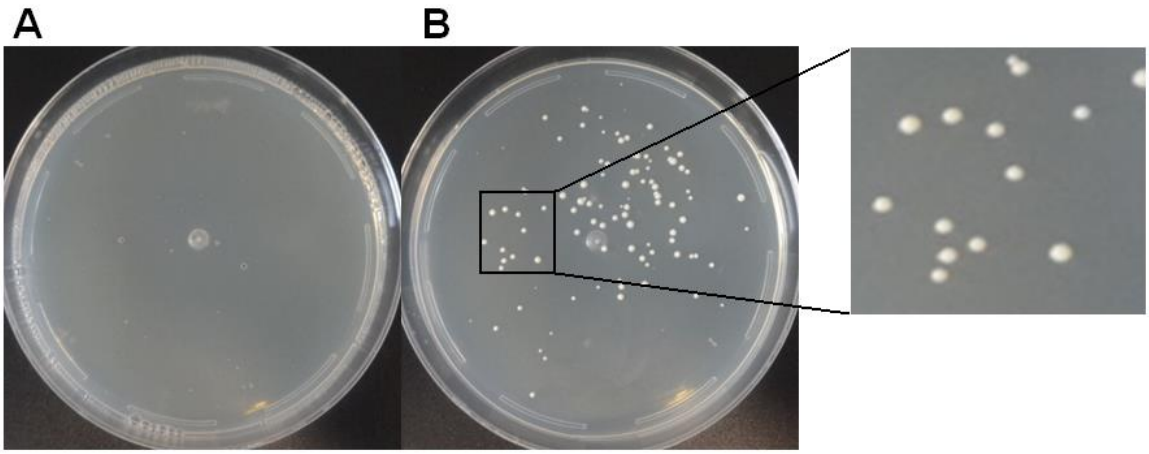


Figura 9. Colonias transformadas con el vector pRSPLAPII-H, cepa diploide 826 de *S. pombe*. Medio de selección YNB con adenina y uracilo.

A) Control negativo de transformación, sin vector
B) Clonas positivas al vector pRSPLAPII-H.

La figura 10 muestra las colonias transformadas de la cepa haploide 4X, el control negativo no presenta crecimiento (imagen A).

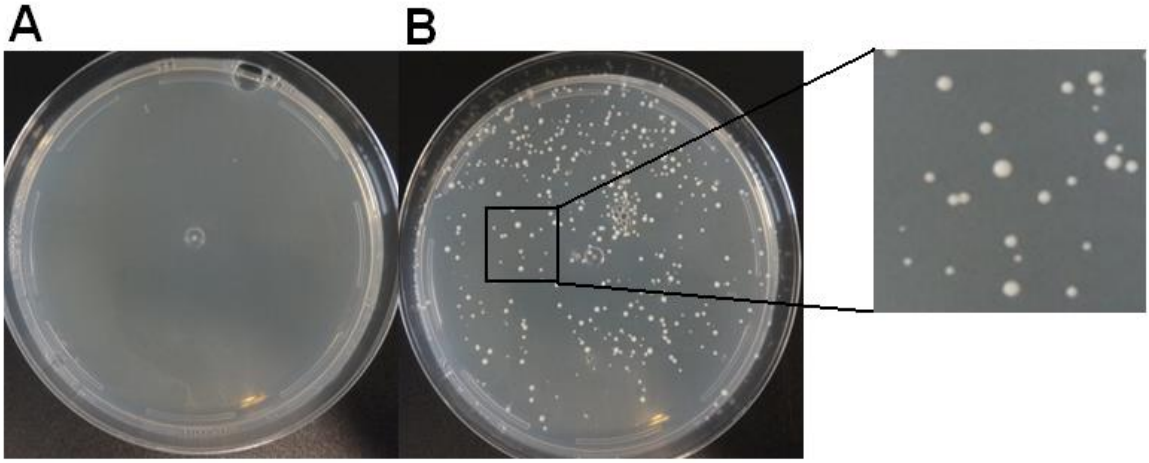


Figura 10. Colonias transformadas con el vector pRSPLAPII-H, cepa haploide 4X de *S. pombe*. Medio de selección YNB con adenina, histidina y uracilo.

A) Control negativo de transformación, sin vector
B) Clonas positivas al vector pRSPLAPII-H.

En ambas transformaciones existe alta eficiencia de transformación, obteniendo así dos cepas sobreproductoras de la LAPyspII-H. Se nombró a estas cepas como 826pLAPII-H y 4XpLAPII-H.

6.3 Producción de la LAPyspII-H en las diferentes cepas sobreproductoras

Para evaluar la sobreproducción de la LAPyspII en las diferentes cepas, se utilizaron las dos cepas transformadas en este trabajo (826pLAPII-H y 4xpLAPII-H) y otra cepa obtenida en el laboratorio en trabajos precedentes la 3DpLAPII-H (López 2010).

Las características genotípicas de estas cepas originalmente son las siguientes:

Cepa *S. pombe*	**Genotipo**	**Procedencia**
Diploide ***826***	*h^+/h^+ leu1-32/ leu1-32, ade6-M210/ade6-M210, ura4-D18/ura4-D18*	ATCC
Haploide ***201399*** Llamada ***4X***	*h^+ ura4-D18, leu1-32, ade6-M210, his7-366*	ATCC
Haploide ***3D***	*h^+ ura4-D18, leu1-32, ade6-250, ape1$^-$, dpa1$^-$*	Villa L y Suárez-Rendueles, 1994.

La cepa 3DpLAPII-H obtenida precedentemente, es una cepa haploide que aparte de las auxotrofías que tiene (leucina, adenina y uracilo), tiene mutado el gen de la aminopeptidasa I (*ape1-*) y el gen de la dipeptidil-aminopeptidasa I (*dpa1-*), aminopeptidasas vacuolares implicadas en la degradación de proteínas para suministro de aminoácidos en la célula. Las obtenidas aquí son haploides o diploides sólo con auxótrofías.

Dado que en el vector recombinante que tienen las cepas sobreproductoras el ORF del gen *ape2*$^+$, está regulado por el promotor negativo de tiamina *nmt1* (figura 9), es importante conocer la concentración de tiamina para mantenerlo apagado y el tiempo necesario para que se encienda al eliminar la tiamina.

Para evaluar la sobreproducción de la LAPyspII y buscar las mejores condiciones de expresión, de las tres cepas sobreproductoras 3DpLAPII-H, 826pLAPII-H y 4xpLAPII-H, se realizó un ensayo con diferentes concentraciones de tiamina en el medio ET (2 µM, 20 µM y 40 µM) y después cambiar las células en medio de expresión (EMM sin tiamina) y recolectar muestras tras 10 horas de crecimiento (D.O. 2) y detectar la LAPyspII por medio de su etiqueta de 6 histidinas.

Los resultados se muestran en la figura 11, la LAPyspII es una peptidasa hexamérica de 320 kDa, cuyo monómero es de 54 kDa, por lo que en la detección de la LAPyspII-H en el western blot, dado que es una PAGE-SDS se espera observar la banda del monómero alrededor de este peso. Como controles negativos se utilizaron los extractos solubles de la cepa silvestre de *S. pombe* 972 y la cepa $3Dh^-$ sin transformar (imagen B, carriles 2 y 3).

En la imagen A se observa como la intensidad de la señal detectada va disminuyendo conforme se aumenta la concentración de tiamina, esto se ocurre para las tres cepas transformadas, también se observa que la cepa sobreproductora 3DpLAPII-H es un mejor sistema de expresión en comparación con la cepas 826pLAPII-H y 4XpLAPII-H pues la intensidad de la señal detectada en estas muestras (carriles 2, 3 y 4) es mucho mayor con respecto a la señal detectada en las muestras de las otras dos cepas (carriles 5-10).

También se observan bandas de menor tamaño que podrían ser degradaciones de la misma LAPyspII-H puesto que no se detectan en los controles negativos.

Con estos resultados se concluyó trabajar con la cepa sobreproductora obtenida en trabajos precedentes 3DpLAPII-H y utilizar una concentración de tiamina de 2 µM en el medio ET para mantener apagado el promotor de la tiamina, y después eliminarla para encender la expresión del ORF del gen *ape2*$^+$.

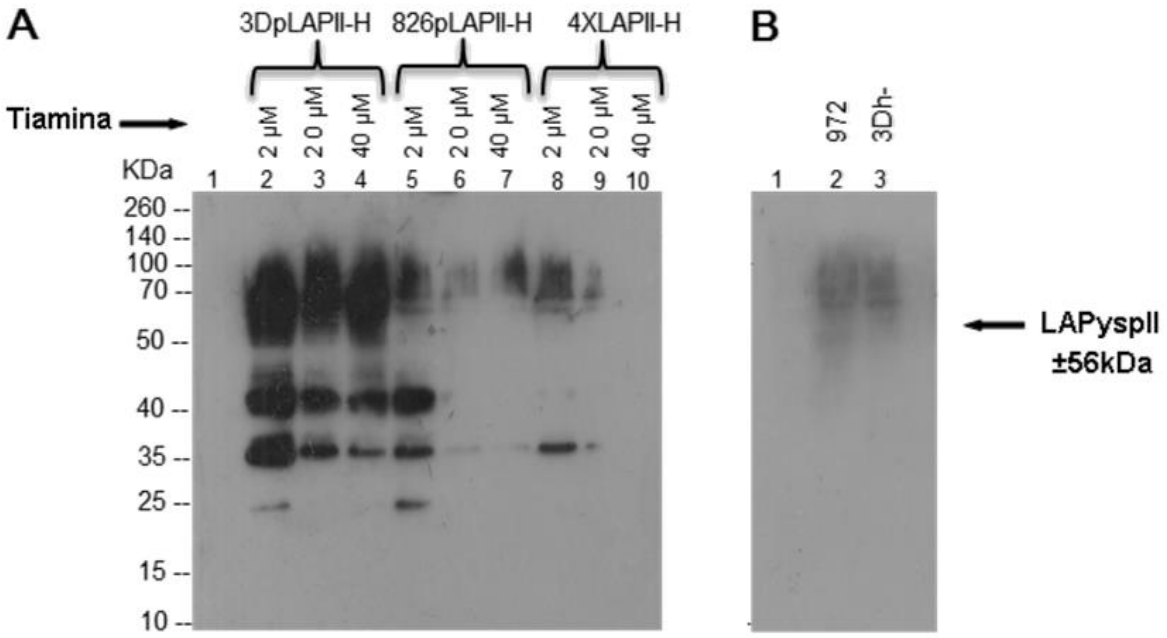


Figura 11. Detección de la LAPyspII-H con anticuerpos anti-histidina, western blot de los extractos solubles, cepas 3DpLAPII-H, 826pLAPII-H y 4xpLAPII-H. Carga 25 µg de proteínas de cada una.

A) Carril 1: marcador de peso molecular. Carril 2, 3 y 4: cepa 3DpLAPII-H (2, 20 y 40 µM tiamina respectivamente). Carril 5, 6 y 7: cepa 826pLAPII-H (2, 20 y 40 µM tiamina respectivamente). Carril 8, 9 y 10: cepa 4xpLAPII-H (2, 20 y 40 µM tiamina respectivamente).

B) Carril 1: marcador de peso molecular. Carril 2: control negativo, cepa 972 de *S. pombe.* Carril 3: control negativo, cepa 3Dh$^-$ de *S. pombe*.

6.4 Condiciones óptimas de producción de la LAPyspII en diferentes etapas del crecimiento celular

Una vez estableciendo que la concentración de tiamina óptima es de 2µM, se determinó el tiempo óptimo de producción de la LAPyspII en el medio de expresión. Se hizo crecer la cepa 3DpLAPII-H bajo medio con tiamina (ET) y posteriormente se realizó una curva de crecimiento en medio de expresión (EMM sin tiamina), tomando muestras a lo largo del crecimiento celular (D.O. 2, 3 y 4). También se creció la cepa original 3Dh$^-$ en medio de expresión como un control basal, y la cepa 3DpLAPII-H en medio con tiamina como control de no

sobreexpresión, dado que el promotor de tiamina se mantiene apagado con la tiamina.

Posteriormente se obtuvo el extracto soluble de las diferentes muestras, se determinaron proteínas totales y actividad enzimática.

La figura 12 muestra la curva de crecimiento celular en medio de expresión (sin tiamina) de la cepa sobreproductora 3DpLAPII-H, de la cepa 3Dh$^-$ sin transformar y como control de promotor de tiamina la cepa sobreproductora 3DpLAPII-H con tiamina.

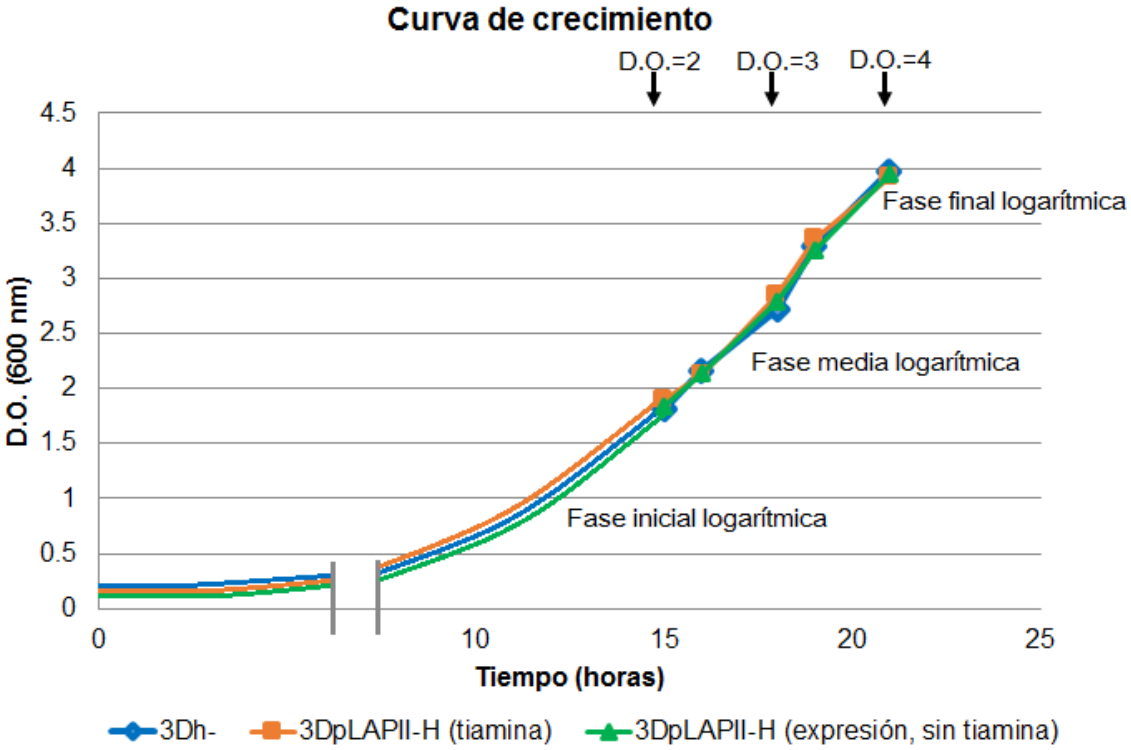


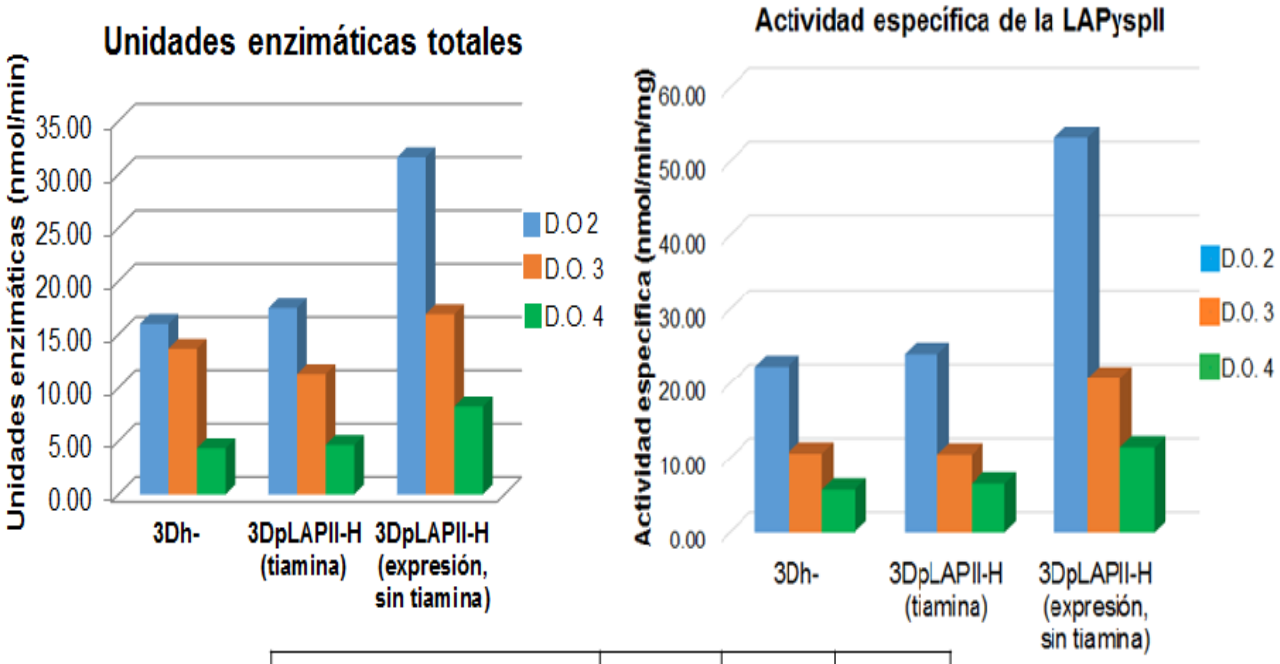
Figura 12. Curvas de crecimiento de las cepas 3Dh$^-$ y 3DpLAPII-H en medio EMM con y sin tiamina.

Se observa que el crecimiento de la cepa 3Dh$^-$ y de la cepa sobreproductora 3DpLAPII-H en medio EMM sin tiamina y medio con tiamina, crecen de manera similar. Para las dos cepas la fase inicial logarítmica se encuentra alrededor de la D.O.=1, la fase media logarítmica se alcanza a las 16 horas y corresponde a la

D.O. = 2, ambas cepas entran a la fase final logarítmica a las 20 horas correspondiendo a una D.O. = 4.

Se tomaron las muestras en la fase media logarítmica (D.O. = 2), en la fase final logarítmica (D.O. = 4) y una muestra entre estas dos fases de crecimiento D.O. = 3). Para cada una se obtuvo el extracto soluble, se determinaron proteínas totales y actividad enzimática

La figura 13 muestra los valores de actividad específica, unidades enzimáticas totales y la relación de proteínas totales para cada extracto celular a D.O. de 2, 3 y 4.



Proteínas totales	D.O. 2	D.O. 3	D.O. 4
3Dh-	0.783	1.285	0.768
3DpLAPII-H (tiamina)	0.794	1.073	0.720
3DpLAPII-H (expresión, sin tiamina)	0.602	0.878	0.718

Figura 13. Actividad específica de la LAPyspII-H de las cepas 3Dh$^-$, 3DpLAPII-H en condiciones de crecimiento con y sin tiamina a una D.O. de 2, 3 y 4. Unidades enzimáticas totales y proteínas totales.

La cepa 3Dh$^-$ de *S. pombe* se utiliza como control basal, por lo que la actividad que se observa en esta cepa corresponde al gen cromosomal de la LAPyspII, esta actividad va decreciendo conforme progresa el cultivo celular hacia la parte final logarítmica. Para la cepa 3DpLAPII-H que creció con tiamina en el medio, el promotor negativo a tiamina permanece apagado por la presencia de ésta en el medio, así que la actividad observada se debe también al gen cromosomal de la LAPyspII, por esta razón la actividad que muestran es muy similar a la cepa basal (3Dh$^-$).

Por otro lado, la cepa sobreproductora 3DpLAPII-H que creció en condiciones de expresión, es decir, sin tiamina donde el promotor se enciende y se sobreproduce la LAPyspII-H presenta una actividad enzimática mayor con respecto a la cepa 3Dh$^-$ y a la cepa transformada que creció en medio con tiamina, teniendo una sobreproducción de la LAPyspII del 157%.

Para todas las cepas se puede observar que a una D.O. = 2, fase media logarítmica del crecimiento de la levadura hay una mayor presencia de la LAPyspII, disminuyendo en un 50% a DO=3 y en un 75% cuando el cultivo está en la fase final logarítmica (DO=4).

Se aprecia que la cepa sobreproductora 3DpLAPII-H presenta una mayor actividad con respecto a la cepa no transformada 3Dh$^-$ con un aumento del 138% a una D.O. = 2, este mismo patrón se observa para la D.O. = 3 y 4.

De esta forma se determinó que la fase donde hay una mejor sobreproducción de la LAPyspII-H es la fase media logarítmico del crecimiento celular que corresponde a una D.O. = 2.

6.5 Purificación de la LAPyspII-H

La purificación se realizó en tres etapas: una para concentrar la muestra y eliminar proteínas precipitando la enzima con sulfato de amonio a saturación; otra pasándola por cromatografía de filtración molecular; y por último pasándola por cromatografía de afinidad con metales inmovilizados (IMAC).

Para realizar el ensayo de purificación se partió de un cultivo de 2 L de medio de inducción (sin tiamina) a DO=2, obteniendo alrededor de 60 mL de extracto soluble, con el cual se trabajó en las etapas de purificación.

6.6 Precipitación con sulfato de amonio a saturación

Con este extracto se procedió a realizar la precipitación con sulfato de amonio, con la finalidad de concentrar la muestra que sería introducida a cromatografía de exclusión molecular.

Para determinar el rango de saturación donde precipita la LAPyspII-H del extracto soluble se realizaron ensayos con sulfato de amonio a saturación correspondiente a los rangos de 0-30%, 30-40%, 40-50% y 50-80%.

La figura 14 muestra la precipitación de la LAPyspII-H en sulfato de amonio a saturación, teniendo en la primera columna el 100% de las unidades enzimáticas totales del extracto soluble del cual se partió para realizar las diferentes precipitaciones.

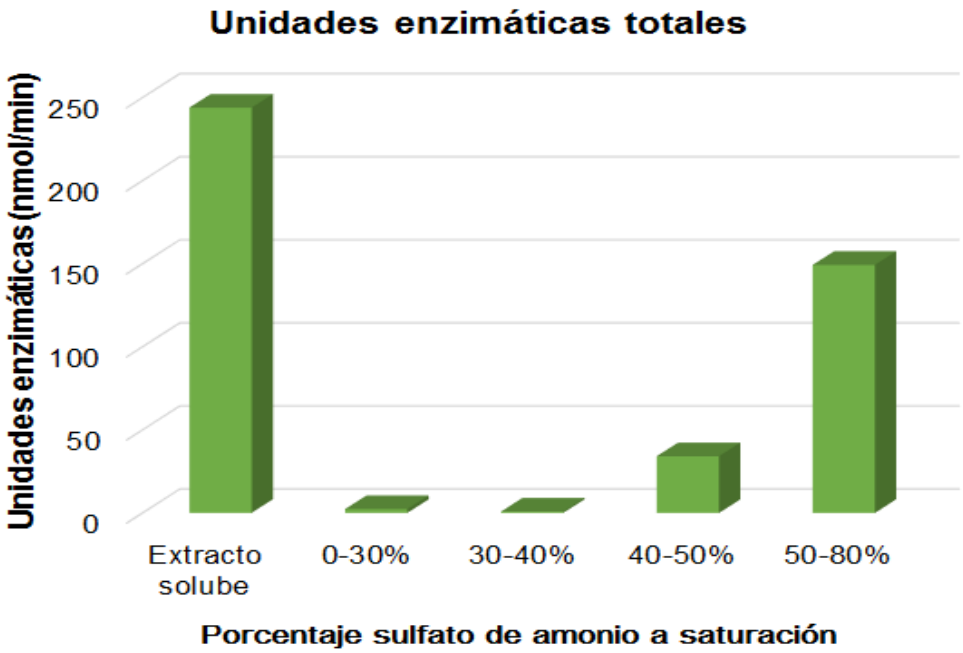


Figura 14. Fraccionamiento de la LAPyspII-H por salado con sulfato de amonio a saturación.
Unidades enzimáticas totales a los diferentes rangos de saturación.

A porcentajes de saturación de 0-30% y 30-40% la cantidad de unidades enzimáticas medidas es baja, por lo que se puede decir que la LAPyspII-H no precipita en estos porcentajes de saturación. Al porcentaje 40-50% existe un 16% de unidades enzimáticas, se piensa entonces que a este rango de saturación la LAPyspII-H comienza a precipitar. En la fracción de 50-80% tenemos las unidades enzimáticas recuperadas en un porcentaje mayor del 65%.

Para tratar de recuperar un mayor porcentaje de enzima, se volvió a obtener el extracto soluble y se fraccionó en rangos de 0-40 y 40-80% de sulfato de amonio a saturación, mostrando los resultados en la figura 15.

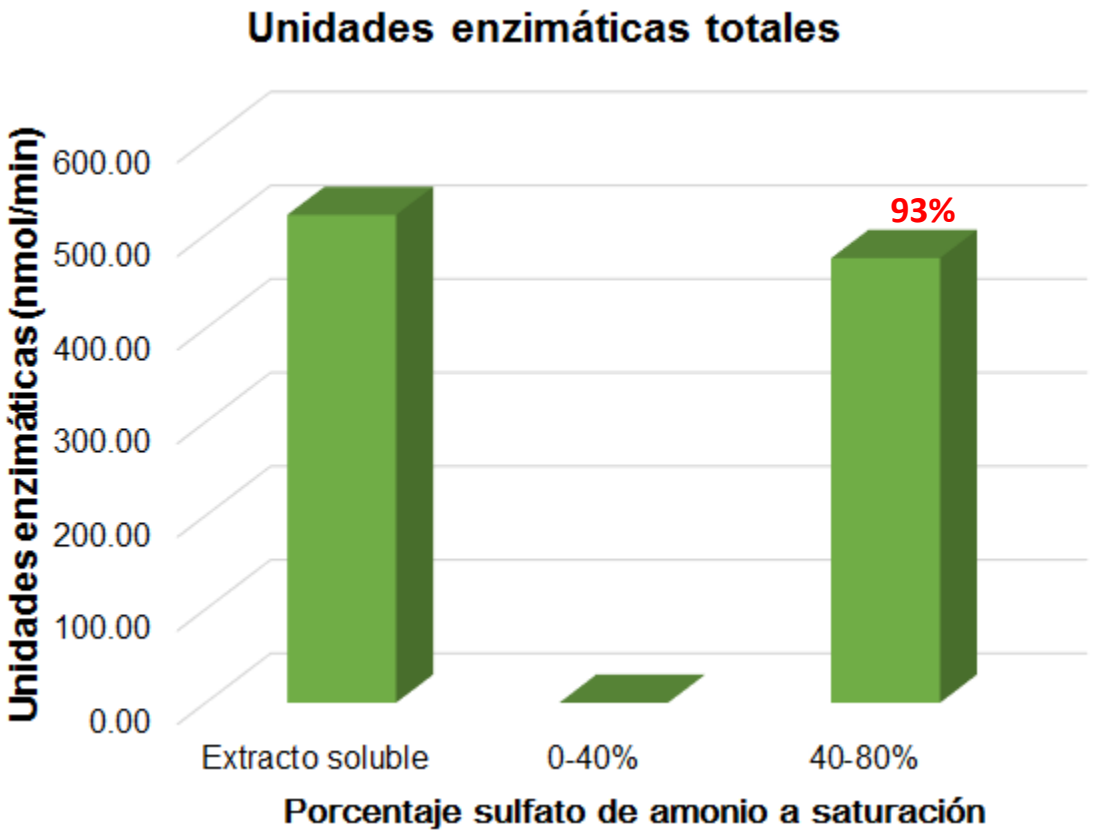


Figura 15. Fraccionamiento de la LAPyspII-H por salado con sulfato de amonio a saturación.
Unidades enzimáticas totales a los diferentes rangos de saturación.

Se observa que en la fracción de 0-40% de saturación de sales, las unidades enzimáticas son muy bajas, y en la fracción de 40-80% precipitan el 93% de la enzima con respecto a la que había en el extracto soluble, logrando así una muy buena recuperación en un volumen pequeño.

De esta forma se cumple con el objetivo de concentrar la proteína para la siguiente etapa en la purificación, la cromatografía de exclusión molecular.

6.7 Cromatografía de exclusión molecular

Para la cromatografía de exclusión molecular el precipitado 40-80% de sales a saturación se resuspendió en 9.5 mL de buffer Tris/HCl 20 mM pH 8 y se dializó por 16 horas a 4°C con agitación constante contra el mismo buffer en el que se resuspendió.

La muestra dializada se cargó en una columna de filtración molecular Sephadex G-200, previamente calibrada en trabajos precedentes. En la figura 16 se muestra el perfil de elución de la LAPyspII-H. Se observa un pico muy ancho de proteínas (absorbancia 280 nm) a pesos moleculares menores de 200 kDa que corresponde al resto de las proteínas en la muestra. Para el caso de nuestra enzima, se observa que la LAPyspII-H eluye en un pico bien definido entre los tubos 10 y 22 (círculos azules), puesto que es una proteína de peso molecular alto es una de las primeras en pasar a través de la columna de filtración molecular.

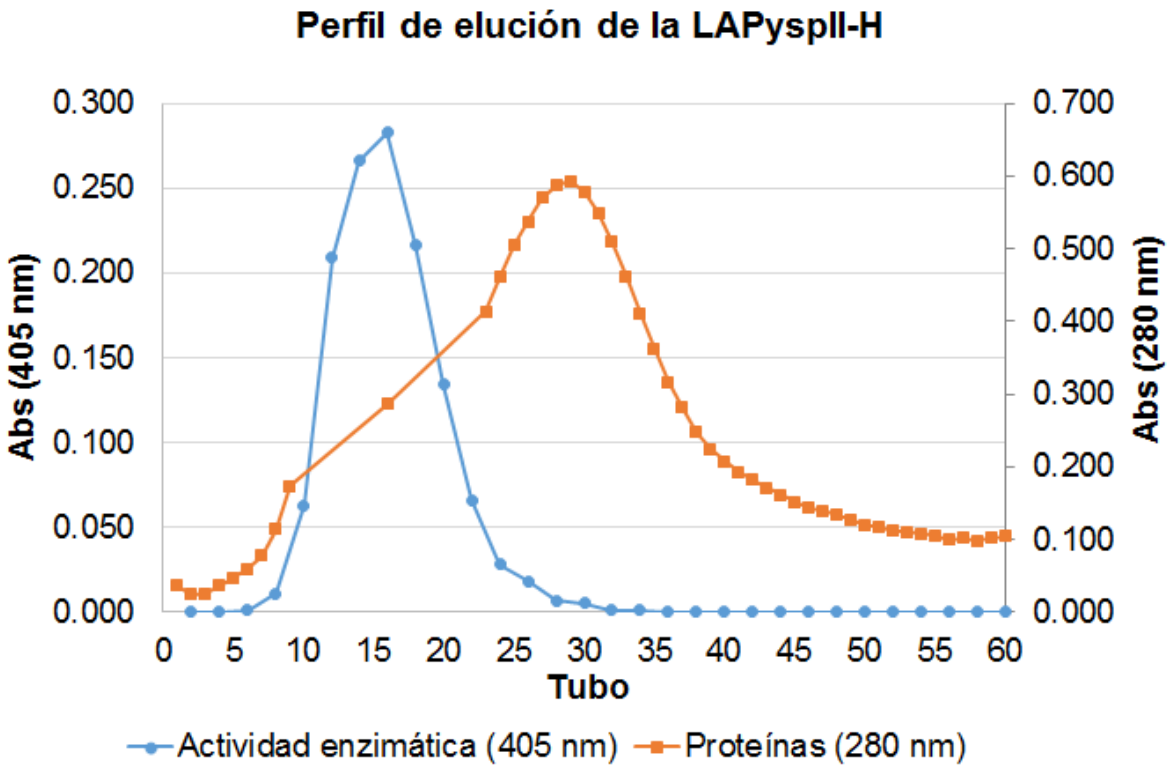


Figura 16. Perfil de elución de la fracción precipitada con sulfato de amonio (40-80%) de la LApyspII-H por cromatografía de exclusión molecular (Sephadex G-200). La actividad enzimática se determinó con 100 µl de muestra.

En el presente trabajo tambien se determinó la masa molecular relativa de la LApyspII-H. Para poder hacer esto se utilizó una curva de calibración de la columna de filtracion molecular, esta curva fue realizada por el estudiante de la licenciatura en Biología, Getulio Flores, en trabajos que se realizan actualmente en el laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular, ICUAP.

La curva de calibracion se realizó calibrando la columna con proteinas de peso molecular conocidos: ferritina, aldolasa, albúmina bovina, ovoalbímina, anhidrasa carbónica y citocromo C. Los datos obtenidos se graficaron calculando el valor V_e/V_0 que corresponden al volumen de elusión de cada muestra y al volumen muerto de la columna respectivamente.

Para determinar la masa molecular relativa de la LApyspII-H se interpoló en la gráfica el valor de V_e sobre V_0 de la LApyspII-H, de esta forma se determinó que la masa molecular relativa corresponde a 330 kDa, mostrado en la figura 17.

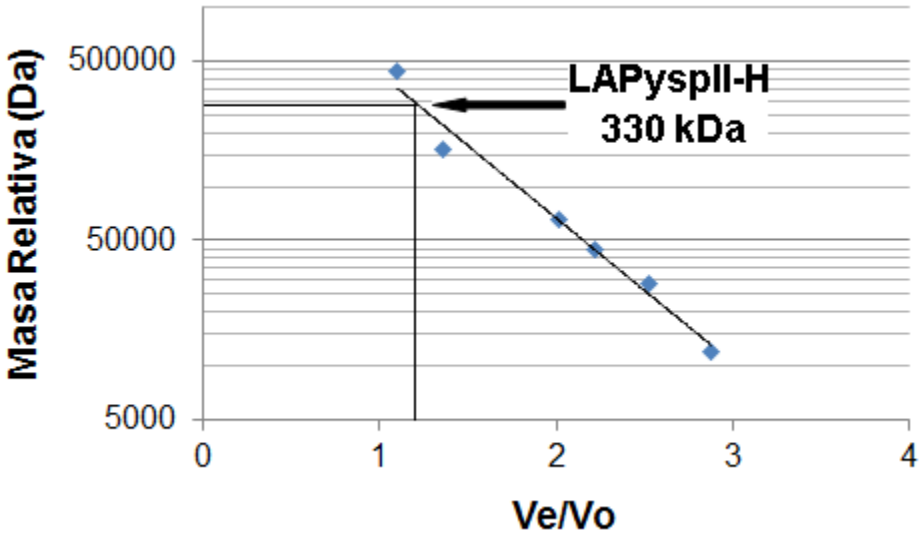


Figura 17. Determinación de la masa molecular de la LApyspII-H por interpolación de la recta. Curva de calibración de la columna de filtración molecular Sephadex G-200 (realizada por el estudiante de la licenciatura en Biología, Getulio Flores). Proteínas marcadoras: ferritina (440 kDa), aldolasa (160 kDa), albúmina bovina (66 kDa), ovoalbúmina (45 kDa, anhidrasa carbónica (29 kDa) y citocromo C (12 kDa).

El peso molecular de la LApyspII reportado es de 320 kDA (Herrera-Camacho, 2007), por lo que el valor obtenido de 330 kDa está dentro del rango, teniendo en cuenta que cada monómero tiene un motivo de 6 histidinas en el extremo n-terminal. Para las leucin aminopeptidasas de diferentes organismos se ha reportado un rango de peso molecular que va de 324 a 357 kDa, por lo tanto la masa molecular relativa calculada por este método se encuentra dentro de este rango.

Para continuar con la purificación de la LApyspII-H se tomaron los tubos del 10 al 22 que presentaron mayor actividad enzimática, se mezclaron y se le determinó actividad enzimática y proteínas totales.

La figura 18 muestra la actividad específica del precipitado con sales y de la elusión en Sephadex. Se observa que después de la cromatografía de exclusión molecular la actividad específica de la LAPyspII-H aumenta más del doble con respecto a la muestra que fue introducida a la columna, esto es indicativo de que en este paso de la purificación se han retirado más proteínas contaminantes de la fracción 40-80% de sales. Por lo tanto se puede continuar con la cromatografía de afinidad.

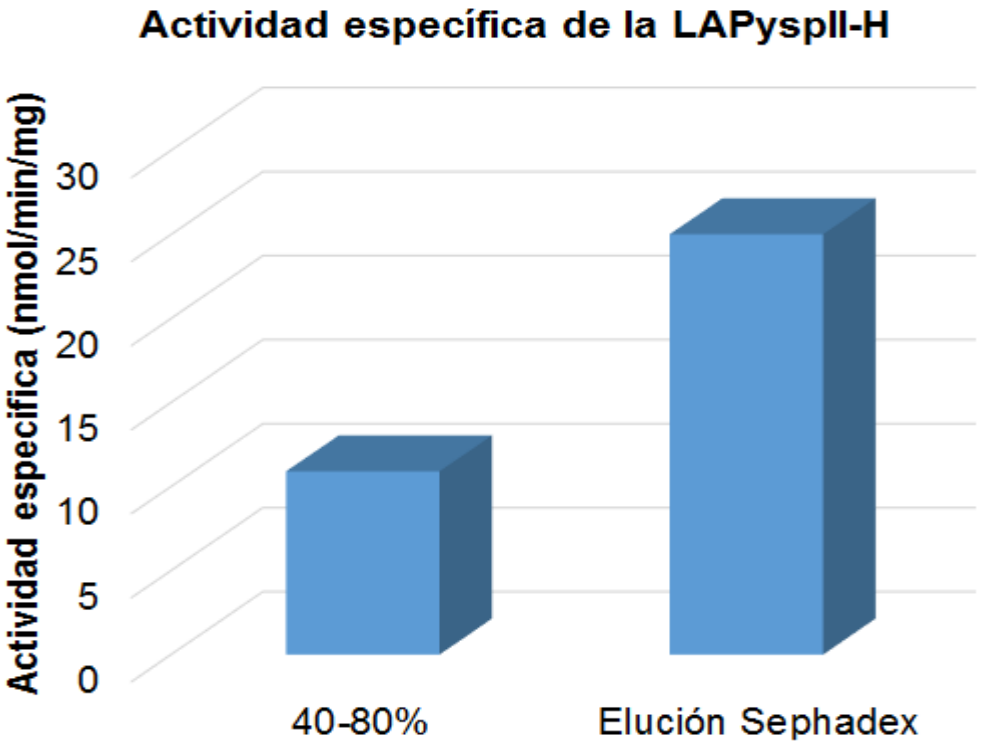


Figura 18. Actividad Específica de la LAPyspII-H. Precipitación con sulfato de amonio de 40-80% con 10 µL de muestra y del pico de elución de la cromatografía de exclusión molecular con 250 µL de muestra.

6.8 Cromatografía de afinidad con metales inmovilizados (IMAC) con Ni-NTA.

Para la purificación de la LAPyspII-H por IMAC se utilizó el sistema de purificación con níquel (Ni-NTA). El motivo por el cual se utilizó este método se debe a que el motivo de las 6 histidinas de nuestra enzima LAPyspII-H exhiben una fuerte interacción con iones metálicos, como lo es el Ni^{+2}, el anillo de imidazol de la histidina funciona como grupo donante de electrones formando fácilmente enlaces de coordinación con el metal de transición inmovilizado (figura 19).

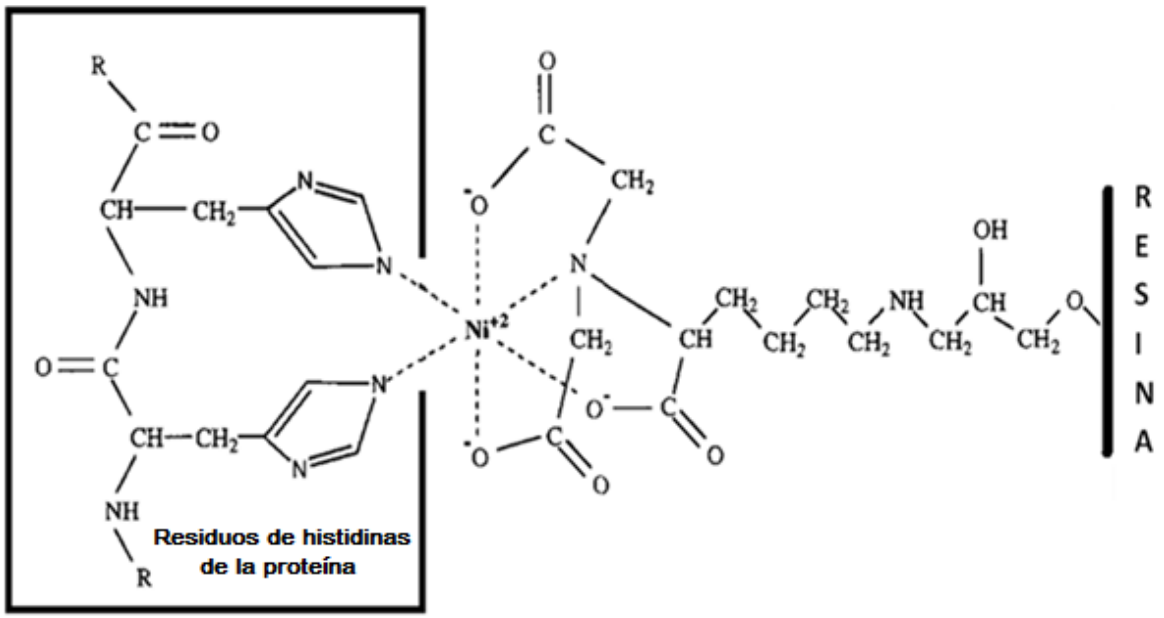


Figura 19. Interacción del grupo imidazol de los residuo de histidina con el sistema Ni-NTA.

Continuando con la purificación de la LAPyspII-H, del pico de elusión de la cromatografía de exclusión molecular de Sephadex G-200, se preparó la muestra y se llevó a cabo el proceso de IMAC señalado en la metodología.

Para eluir la proteína se utilizaron concentraciones altas de imidazol (300 mM), el cual ayuda a romper completamente la interacción de las histidinas de la enzima con los iones Ni^{+2} inmovilizados, debido a que el imidazol compite fuertemente con estos iones, desplazando a la proteína.

Para cada fracción colectada se midió la cantidad de proteínas (absorbancia 280 nm) para seguir el comportamiento de la purificación. En la figura 20 se muestra el perfil de elusión de la proteína a través del IMAC.

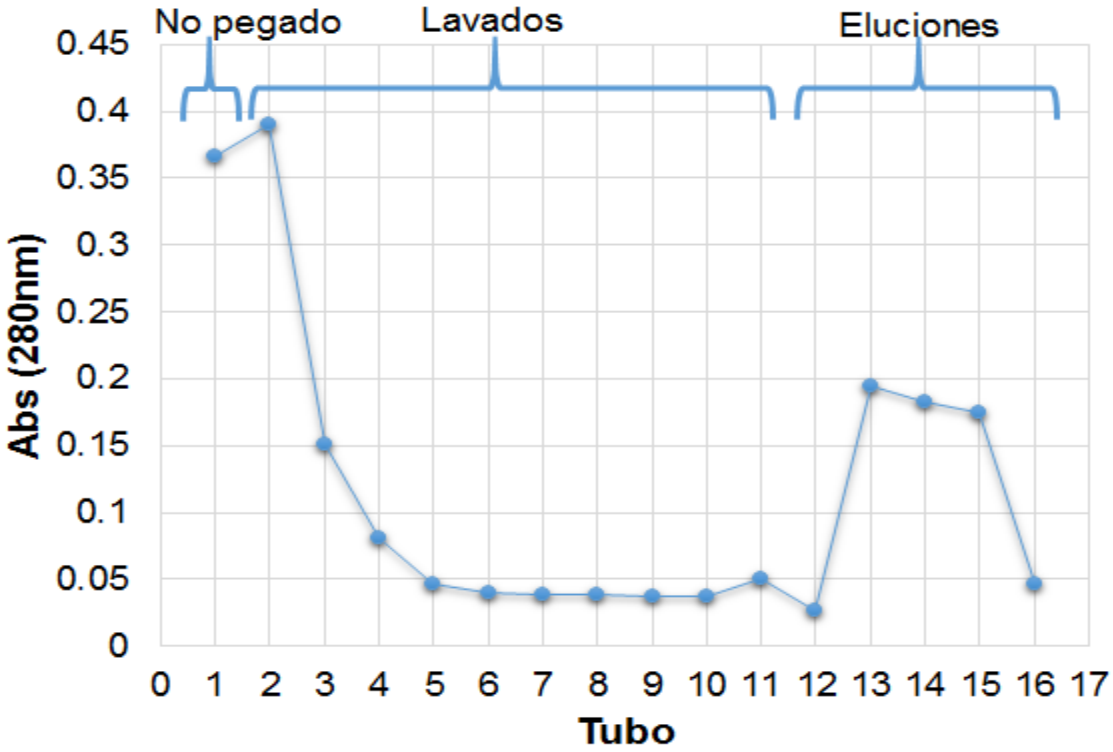


Figura 20. Perfil de elución de la LAPyspII-H por cromatografía de afinidad con metales inmovilizados IMAC Ni-NTA.
Flujo constante de 0.2 mL/min, se colectaron 8 mL para la fracción no pegado y para las demás fracciones (lavados y eluciones) tubos de 3 mL cada uno. Tubo 1 (8 mL): No pegado. Tubos 2-11(30 mL): Lavados. Tubos 12-16 (15 mL): Eluciones.

Después de inyectar la muestra, se observa una absorbancia alta de proteínas correspondientes a las que no se pegaron, que indica la presencia de proteínas contaminantes en la muestra las cuales no interaccionan de ninguna manera con el níquel. Con los lavados se observa como la absorbancia va disminuyendo eliminando las proteínas que podrían estar retenidas de forma muy débil, teniendo que con las dos series de lavados se están eliminando algunas proteínas contaminantes que no salieron al principio. Finalmente con concentraciones elevadas de imidazol (300mM) se eluye la enzima, observando en las elusiones un pico de proteína definido que nos sugiere es la LAPyspII-H.

Las fracciones obtenidas de la purificación se juntaron para obtener así tres muestras en total: la fracción no pegada, los lavados y las elusiones, las cuales una vez dializadas para eliminar las sales y el imidazol, se procedió a determinar cantidad de proteínas y actividad enzimática.

La figura 21 muestra los resultados obtenidos, observando que la muestra que presenta una mayor actividad específica es la fracción de elución, indicándonos que la LAPyspII-H se pega muy bien a la columna y que la logramos despegar con altas concentración de imidazol.

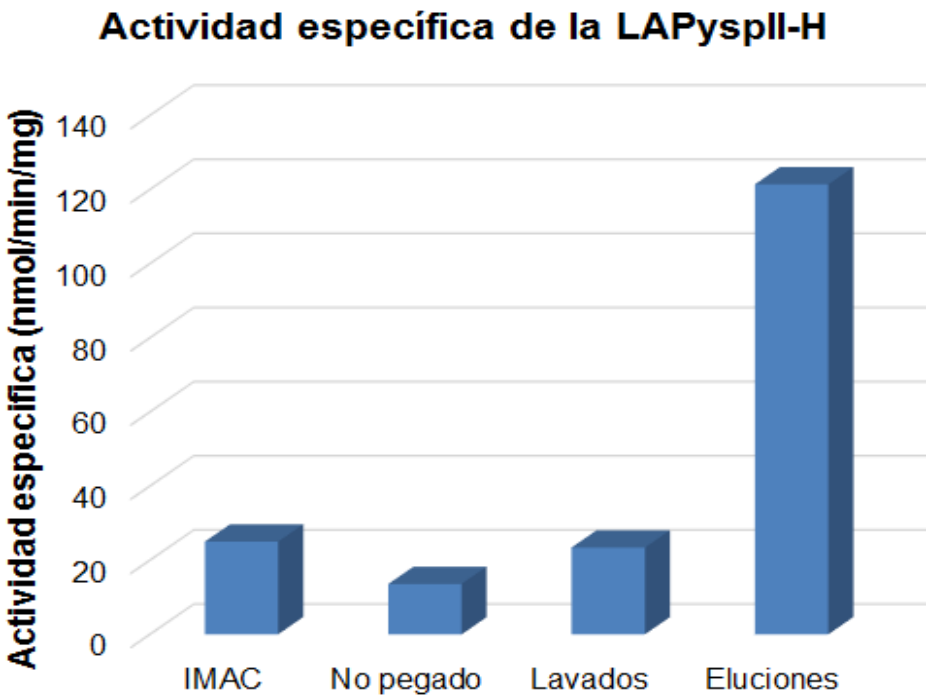


Figura 21. Actividad de la LAPyspII-H de las fracciones de la purificación por IMAC-Ni-NTA.

IMAC: Muestra antes de la purificación, y fracciones de purificación (no pegado, lavados y elusiones)

Para hacer un balance de las diferentes etapas de la purificación utilizadas se calculó el rendimiento con las unidades enzimáticas y el factor de purificación con la actividad específica. La tabla 6 muestra los resultados obtenidos.

Tabla 6. Resumen de las etapas de purificación de la LApyspII-H

	Proteínas totales (mg)	Unidades enzimáticas totales (nmol/min)	Actividad específica (nmol/min/mg)	Rendimiento %	Factor de purificación
Extracto soluble	*93.03*	*521.21*	*5.60*	*100.00*	*1.00*
Precipitación 40-80% con sulfato de amonio	*43.56*	*475.00*	*10.90*	*91.13*	*1.95*
Exclusión molecular Sephadex G-200	*5.66*	*141.57*	*25.01*	*29.80*	*4.46*
IMAC Ni-NTA	*0.08*	*10.04*	*128.72*	*7.10*	*22.97*

Se observa como la concentración de proteínas disminuye con cada etapa de purificación, teniendo 93.03 mg de proteínas en el extracto soluble hasta 0.08 mg al final de la purificación. Tenemos un rendimiento global del 7%, el cual es un bajo debido a que en la etapa final de purificación por IMAC se emplean buffers con concentraciones altas de NaCl que afectan directamente la actividad de la enzima y por lo tanto el rendimiento de la purificación. Sin embargo, en la cromatografía por afinidad a metales la LApyspII-H presentó la actividad específica más alta con respecto a los pasos anteriores de la purificación. Este resultado se ve reflejado directamente en el factor de purificación, el cual aumentó considerablemente de 1 a 23.

6.9 Identificación de la LApyspII por western-blot y grado de pureza en la purificación.

El método para la evaluación de la pureza obtenida es la electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (PAGE-SDS) y su posterior identificación por detección en western blot.

En la figura 22 se muestra el gel teñido con azul de Coomasie.

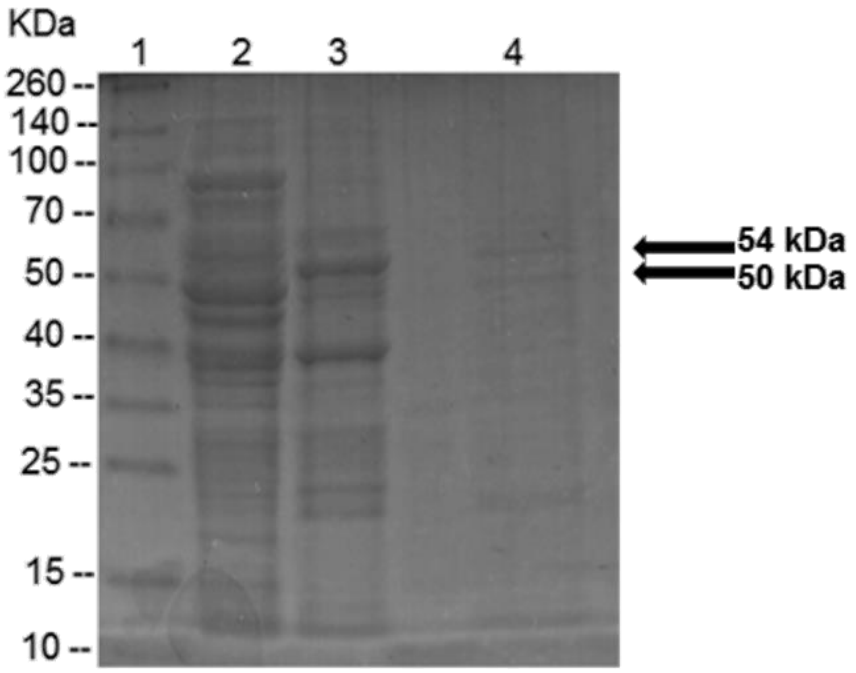


Figura 22. PAGE-SDS teñido con azul de Coomasie de las etapas de purificación de la LApyspII-H
Carril 1: marcador de peso molecular.
Carril 2: precipitación 40-80%.
Carril3: pico de filtración molecular (muestra antes de la purificación por IMAC.
Carril: 4: fracción de la elusión de la enzima por IMAC.
La fracción eluida obtenida de la purificación por IMAC se concentró con Aquacide, para su posterior precipitación con acetona. Se cargaron 25 µg de proteínas en los geles de poliacrilamida de cada fracción de la purificación.

En el carril 2 está la muestra de la fracción precipitada con sales (40-80%) donde se observan numerosas bandas correspondientes a cadenas polipeptídicas de las proteínas presentes. En el carril 3, está el pico de filtración molecular, con posterior tratamiento antes de cargarlo a la columna de IMAC, teniendo ya un menor número de bandas, es importante observar que hay una banda más intensa alrededor de 55 KDa que en principio es el peso molecular del monómero de la LApyspII. Por último en el carril 4 tenemos la fracción eluida con mayor actividad enzimática de IMAC observando muy pocas bandas de cadenas polipeptídicas, pero teniendo también dos bandas más intensas, entre 50 y 55 KDa.

Finalmente era importante identificar la banda proteína de la LApyspII, esto lo hicimos por la técnica de western-blot utilizando anticuerpos anti-histidina, los cuales van a reconocer el motivo de 6 histidinas que tienen los monómero en la parte N-terminal de la LApyspII.

Para este último experimento, pusimos la muestra que se metió a IMAC, y las tres fracciones de la purificación por IMAC (no-pegado, lavado y elusión). En la figura 23 se muestran los resultados obtenidos.

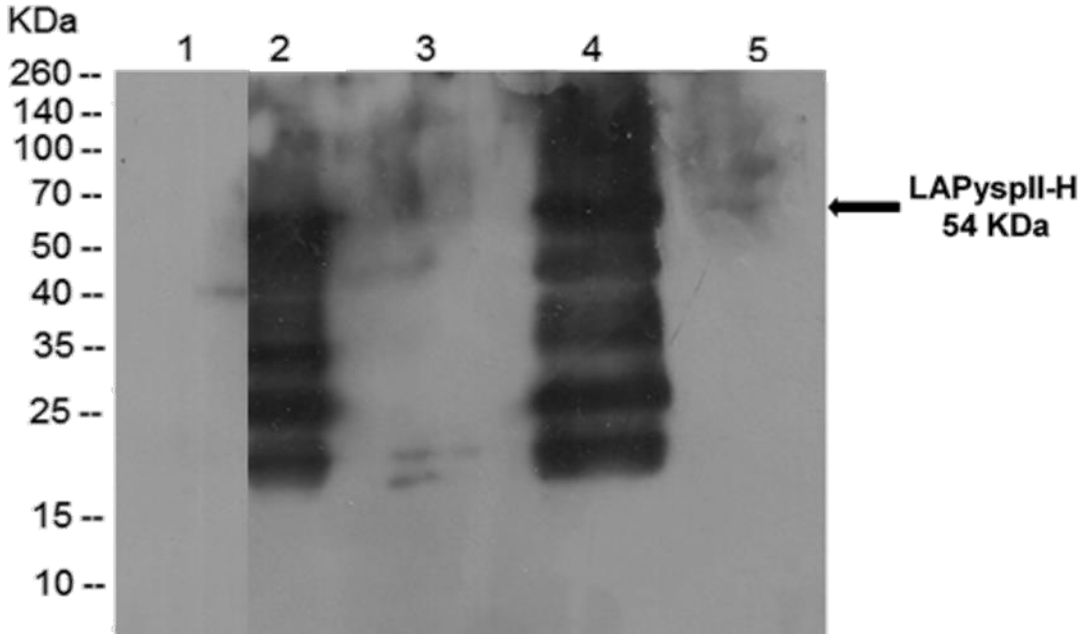


Figura 23. Western blot correspondiente a la purificación de la LApyspII-H con la resina Ni-NTA-IMAC.
Carril 1: marcador de peso molecular.
Carril 2: muestra antes de la purificación por IMAC.
Carril 3: fracción no pegado.
Carril 4: fracción eluida LApyspII-H.
Carril 5: fracción lavados.

Se observa que durante la cromatografía de IMAC, en la fracción de no-pegado (carril 3) y en la fracción de lavado (carril 5) no hay ninguna banda reconocida por los anticuerpos anti-histidina, por lo que nuestra enzima LAPyspII, se pega bien a la columna y no sale en el lavado.

Por otra parte se tiene una banda importante de alrededor de 54 kDa en la muestra antes de la cromatografía IMAC (carril 2) y en las eluciones de la cromatografía (carril 4), esta banda corresponde al monómero de la LAPyspII-H. Vemos también una serie de bandas tanto en la muestra que se mete a la columna (carril 2) como en la elusión de la enzima (carril 4) que son reconocidas por el anticuerpo anti-histidina, por lo que podríamos pensar que son degradaciones del monómero de la LAPyspII.

7. CONCLUSIONES

- Se obtuvieron dos cepas sobreproductoras de la leucin aminopeptidasa yspII con un motivo de 6 histidinas en el amino N-terminal (LAPyspII-H). Una cepa diploide 826pLAPII-H y una cepa haploide 4XpLAPII-H.

- La cepa sobreproductora 3DpLAPII-H, obtenida en trabajos precedentes, es un mejor sistema de expresión que las cepas sobreproductoras obtenidas en este trabajo.

- Las condiciones óptimas de expresión son, mantener primero apagado el promotor con 2 µM de tiamina y después cambier a un medio sin tiamina para su expresión, siendo la fase óptima de producción de la LAPyspII-H la fase media logarítmica (D.O.= 2), con una sobreproducción del 157% con respecto a la cepa no transformada ($3Dh^-$).

- La LAPyspII-H precipita en la fracción 40-80% de saturación con sulfato de amonio, teniendo el 93% de la enzima con respecto al extracto soluble, logrando así una muy buena recuperación en un volumen pequeño.

- Por cromatografía de filtración molecular se determinó una masa relativa de de 330 kDa para la LAPyspII-H.

- La cromatografía de afinidad con metales inmovilizados es un buen método para la purificación de la LAPyspII-H. A pesar de esto, se observa un gran porcentaje de degradación de la enzima a lo largo de la purificación, lo que explica la baja actividad enzimática que se obtiene de la fracción de eluciones.

8. PERSPECTIVAS

En futuros experimentos se tendrá que valorar las condiciones utilizadas, y ensayar otras tratando de evitar la degradación de la LAPyspII. Considerar utilizar combinaciones de inhibidores de proteasas en los diferentes pasos para la purificación de la proteína.

Un método para evitar la proteólisis es la PEGilación de la proteína recombinante, que consiste en la conjugación de una proteína con moléculas de poli etilenglicol, pudiendo separar el conjugado por métodos cromatográficos.

También se pueden utilizar otros sistemas diversos de expresión como:

- *P. pastoris*, capaz de enviar la proteína recombinante al medio extracelular y recuperarla la proteína en el medio de cultivo, sin la necesidad de la ruptura celular.
- *E. coli, que* acumula la proteína en el citoplasma en cuerpos de inclusión, que podrían proteger a la proteína de la proteólisis, y pueden ser separados por centrifugación continua.

9. BIBLIOGRAFÍA

Arbesú M.J., Valle E., Suárez-Rendueles P. Purification and characterization of aminopeptidase yspI from *Schizosaccharomyces pombe*. Yeast. 1993. 9(6):637-44.

Attaix D., Combaret L., Pouch M.-N., and Taillandier D. Cellular control of ubiquitin-proteasome-dependent proteolysis. *J ANIM SCI.* 2002. 80:E56-E63.

Betancourt Y. Estudio bioquímico y molecular de las proteasas vacuolares de *Candida glabrata*. 2009. Tesis de maestría. México. D. F.

Beyond R. and Bond J. Proteolityc enzymes: A practical approach. Oxford University. England. IRLPRESS.1998.

Cruz Ramón J. Construcción de un vector de clonacion que sobreesprese la leucin aminopeptidasa yspII de *Schizosaccharomyces pombe.* 2006. Tesis de licenciatura. Escuela de Biología. BUAP. México.

Grembecka J. and Kafarski P. Leucine Aminopeptidase as a Target for Inhibitor Design. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry,* Bentham Science Publishers, Ltd. 2001. 1: 133-144

Gutiérrez Díaz N. Leucin aminopeptidasa yspII de *Schizosaccharomyces pombe:* obtención de mutantes por deleción del gen *ape2*$^{+}$ y caracterización de su fenotipo*.* 2014. Tesis de maestría. Posgrado en Ciencias Químicas. Instituto de Ciencias. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. México.

Herrera-Camacho I., Rosas-Murrieta N. H., Rojo-Domínguez A., Millán L., Reyes-Leyva J., Santos-López G., Suárez-Rendueles P. Biochemical characterization and structural prediction of a novel cytosolic leucyl aminopeptidase of the M17 family from *Schizosaccharomyces pombe.* FEBS Journal. 2007. 274, 6228-6240.

Lee JY, Song SM, Seok JW, Jha B, Han ET, Song HO, Yu HS, Hong Y, Kong HH, Chung DI. M17 leucine aminopeptidase of the human malaria parasite Plasmodium vivax. Molecular and Bioquimical Parasitology. 2010. 170, 45-48.

Lehninger Albert L. Principios de bioquímica. 2005. Cuarta edición. Omega

Lindner P. *Schizosaccharomyces pombe* sp. Nov., a new ferment. 1983. Wochenschift fur Braureri. 10:1298-1300. Tomado de FRANS Hochstenbach y Norman Hu.

López Martínez M. A. Optimización de la sobreproducción de la leucinaminopeptidasa yspII con un motivo de histidinas de *Schizosaccharomyces pombe* y condiciones de purificación. 2012. Tesis de licenciatura. Facultad de ciencias químicas. BUAP. México

López Osorno J. Construcción de un vector recombinante que exprese la leucina aminopeptidasa yspII con un motivo de 6 histidinas en el extremo N-terminal. 2010. Tesis de licenciatura. Facultad de ciencias químicas. BUAP. México.

López Otín C. and Overall M. C. Protease degradomics: a new challenge for proteomics. Nature reviews, molecular cell biology. 2002. 509-518.

Malapeira Argilaga J. Función biológica y regulación de la ciclina específica de meiosis Rem1 en *Schizosaccharomyces pombe.* 2006. Tesis Doctoral. Universitat Pompeu Fabra Barcelona.

Martinez M., Sovak G., Cuervo A. Protein degradation and aging. Experimental Gerontology. 2005. 40 622–633.

Mathews C., Van Holde K. V., Ahern K. G. Bioquímica. 2002. Tercera edición.

Matsui M., Fowler J. H., Walling L. L. Leucine aminopeptidases: diversity in structure and function. Biol Chem. 2006. 387, 1535-1544.

Neurath H. Proteolytic enzymes, past and future. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999. Vol. 96, pp. 10962–10963.

Neurath Hans. Proteolytic enzymes, past and future. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999. Vol. 96, pp. 10962–10963.

Neurath H., Walsh K. Role of proteolytic enzymes in biological regulation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1976. Vol. 73, No. 11, pp. 3825-3832.

Osmulski P. A., and Gaczynska M. A new large proteolityc complex distinct form the proteasome is present in the cytosol of fission yeast. Curr. Biol. 1998. 8:1023–1026.

Rao M., Tanksale A., Ghatge M. and Deshpande V. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 1998. 62(3):597.

Regidor Cerrillo J. Estudio de la expresión del receptor mGluR1a del sistema nervioso central de Rattus novergicus en la levadura *Schizosaccharomyces pombe* y líneas celulares de mamífero. 2001. Tesis de doctorado. Madrid.

Rivera Juárez M. Leucín aminopeptidasa yspII de *Schizosaccharomyces pombe*. Sobreproducción, purificación, estudio cinético de competición de iones y modelado del dominio N-terminal. 2009. Tesis de maestría. Posgrado en Ciencias Químicas. Instituto de Ciencias. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. México.

Rodríguez López J.N. Proteólisis intracelular. Recambio proteico. 2003. Tesis de licenciatura. España.

Sanz Y. Aminopeptidases. Industrial Enzymes. Springer. 2007. 243–260.

Sato Y. Role of Aminopeptidase in Angiogenesis. Biol. Pharm. Bull. 2004. 27(6) 772—776.

Sedmak J. J. AND Grossberg E. S. A Rapid, Sensitive, and Versatile Assay for Protein Using Coomassie Brilliant Blue G250. Anal Biochem. 1976. 1; 79(1-2):544-52.

Starkova N. N., Koroleva E. P., and Rotanova T. V. Intracellular Proteolysis: Signals of Selective Protein Degradation. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry. 2000. Vol. 26, No. 2, pp. 71-84.*

Suárez Rendueles P., Villa L., Arbesú M. J. and Escudero B. The proteolityc system of the fission yeast. *Schizosaccharomyces pombe*. FEMS Microbiol. Lett.1994. 81: 215-220.

Tylor A. Aminopeptidases: structure and function. The FASEB journal. 1993. Vol 7: 290-298.

Villa L. and Suárez Rendueles P. Dipeptidyl aminopeptidase yspI mutants of *Schizosaccharomyces pombe:* Genetic mapping of *dpal*$^{+}$ on chromosome III. FEMS Microbiology Letters. 1994. 120, 211-216.

Wilkinson C. R. M., Penney M., McGurk G. Wallace M. and Collin G. The 26S proteasome of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. 1999. 354: 1523-1532.

Wixon J. Featured organism: *Schizosaccharomyces pombe,* the fision yeast. Comp Funct Genom. 2002. 3: 194-204.

Wood V., Gwilliam R., Rajandream M.-A., M. Lyne, R. Lyne. The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. Nature. 2002. Vol. 415. 2.

Young Yoon H., Hee Shim S., Ju Baek L. and Hong J. L. Small-molecule probe using signals to monitor leucine aminopeptidase activity. Bioorg Med Chem Lett. 2011. 21, 2403-2405.

Zhang S., Yang X., Shi H., Li M., Xue Q., Ren H., Yao L., Chen X., Zhang J., Wang H. Overexpression of leucine aminopeptidase 3 contributes to malignant development of human esophageal squamous cell carcinoma. J Mol Hist. 2014. 45:283–292

10. ANEXOS

10.1 Anexo 1

Medios de cultivo

Medio LB (Luria-Bertani)

Reactivo	Concentración/L
Peptona de caseína	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	5 g

Ajustar el pH a 7.5. La esterilización se realizó en una autoclave vertical a 15 libras de presión durante 20 minutos. Se agregó ampicilina para obtener una concentración final de 100 µg/mL al medio de cultivo estéril y atemperado en campana de flujo laminar.

Medio mínimo YNB

Reactivo	Concentración/L
YNB	7.7 g
Acetato de sodio	1.0 g
Cloruro de potasio	0.9 g
Glucosa	20 g
Vitaminas 1000X	1 mL
Aminoácidos 50X	20 mL

El medio mínimo YNB se complementó con un complejo vitamínico estéril compuesto por ácido cítrico (1 mg/mL), acido nicotínico (10 mg/mL) y m-inositol (10 mg/mL). Los medios solidos se prepararon añadiendo 3% de agar. La esterilización de los medios de cultivo se realizó en una autoclave vertical a 15 libras de presión durante 20 minutos. El complejo vitamínico se esterilizó por filtración utilizando un filtro de 2 µM, se agregó al medio de cultivo estéril y atemperado en campana de flujo laminar.

Medio EMM (medio E)

Reactivo	Concentración/L
Ácido ftálico	3 g
Na_2HPO_4	2.24 g
NH_4Cl	5 g
Sales	20 mL
Glucosa	20 g
Vitaminas 1000X	1 mL
Minerales 10000X	100 µL
Aminoácidos 50X	20 mL
Tiamina 1000X (adicionar cuando se prepara medio EMM + T)	400 µL

Sales

Reactivo	Concentración/L
$MgCl_2.6H_2O$	53.5 g
$CaCl_2.2H_2O$	0.75 g
KCl	50 g
Na_2SO_4	2 g

Vitaminas 1000X

Reactivo	Concentración/ 100 mL
Ácido pantoténico	0.1 g
Ácido nicotínico	1.0 g
Inositol	1.0 g
Biotina	10 mg

Minerales 10000X

Reactivo	Concentración/100 mL
Ácido bórico	500 mg
$MnSO_4$	400 mg
$ZnSO_4$	400 mg
$FeCl_2.6H_2O$	200 mg
Ácido molíbdico	160 mg
KI	100 mg
$CuSO_4.5H_2O$	40 mg
Ácido cítrico	1 g

Aminoácidos 50X

Reactivo	Concentración
L-Uracilo	0.625 g/100 mL de NaOH 0.1 N
L-Leucina	1.25 g/100 mL de H_2O
L-Adenina	0.625 g/100 mL de HCl 0.1 N
Histidina	1.125 g/100 mL de H_2O
Lisina	1.125 g/100 mL de HCl 0.1 N

Tiamina

Reactivo	Concentración
Tiamina	5 mM

El complejo vitamínico 1000X, los minerales 10000X, la tiamina 1000X y los aminoácidos Histidina y Lisina se esterilizaron por filtración con un filtro de 2 µM agregándose al medio de cultivo estéril y atemperado en campana de flujo laminar. La esterilización de los medios de cultivo y los aminoácidos L-Uracilo, L-Leucina y L-Adenina se realizó en una autoclave vertical a 15 libras de presión durante 20 minutos. Todos los medio se prepararon con agua desionizada y estéril.

Soluciones

Maxiprep

Solución I

Reactivo	Concentración
Glucosa	50 mM
Tris/HCl pH 8	25 mM
EDTA	10 mM

Esterilizar en autoclave vertical a 15 libras de presión durante 20 minutos y guardar a 4 °C.

Solución II

Reactivo	Concentración
NaOH	0.2 N
SDS	1%

Preparar la solución al momento de la realización del protocolo de extracción del plásmido.

Solución III

Reactivo	Concentración/100 mL
Acetato de potasio 5M	60 mL
Ácido acético glacial	11.5 mL
H_2O	28.5 mL

TBE 5X

Reactivo	Concentración/L
Tris base	54 g
Ácido bórico	27.5 g
EDTA	20 mL 0.5 M pH 8.0

Buffer de zimoliasa

Reactivo	Concentración/L
Ácido cítrico	50 mM pH 5.6
Na_2HPO_4	50 mM pH 5.6
EDTA	40 mM pH 8.0
Sorbitol	1.2 M

TE 5X pH 7.5

Reactivo	Concentración/L
Tris/HCl	50 mM pH 7.5
EDTA	5 mM pH 8.0

El TE se preparó haciendo una dilución 1:5 con agua destilada estéril.

10.2 Anexo 2

<u>Cromatografía de afinidad con metales inmovilizados (IMAC Ni-NTA)</u>
Pasos para preparar la columna:

1. Resuspender la resina Ni-NTA en su botella
2. Adicionar 3 mL de la suspensión en una columna de purificación de 10 mL, dejar sedimentar y eliminar el alcohol.
3. Adicionar 6 mL de agua destilada estéril, resuspendiendo la resina, dejar sedimentar y eliminar el agua.
4. Para la purificación en condiciones nativas, agregar 6 mL de buffer de unión y dejar en agitación suave por 1 hora a 4 °C.
5. Dejar que la resina compacte y eliminar el buffer.

Para almacenar la resina, después de la purificación, lavar con 12 mL de NaOH 0.5 M y 12 mL de agua destilada estéril. Pasar 12 mL de etanol al 20%. Dejarla en etanol al 20%.

Soluciones buffer para la purificación

Buffer de unión pH 8

50 mM NaH_2PO_4

300 mM NaCl

20 mM Imidazol

Buffer de lavado pH 8

50 mM NaH_2PO_4

300 mM NaCl

20 mM Imidazol

Buffer de lavado con alta concentración de NaCl pH 8

50 mM NaH_2PO_4

1 M NaCl

20 mM Imidazol

Buffer de elución pH 8

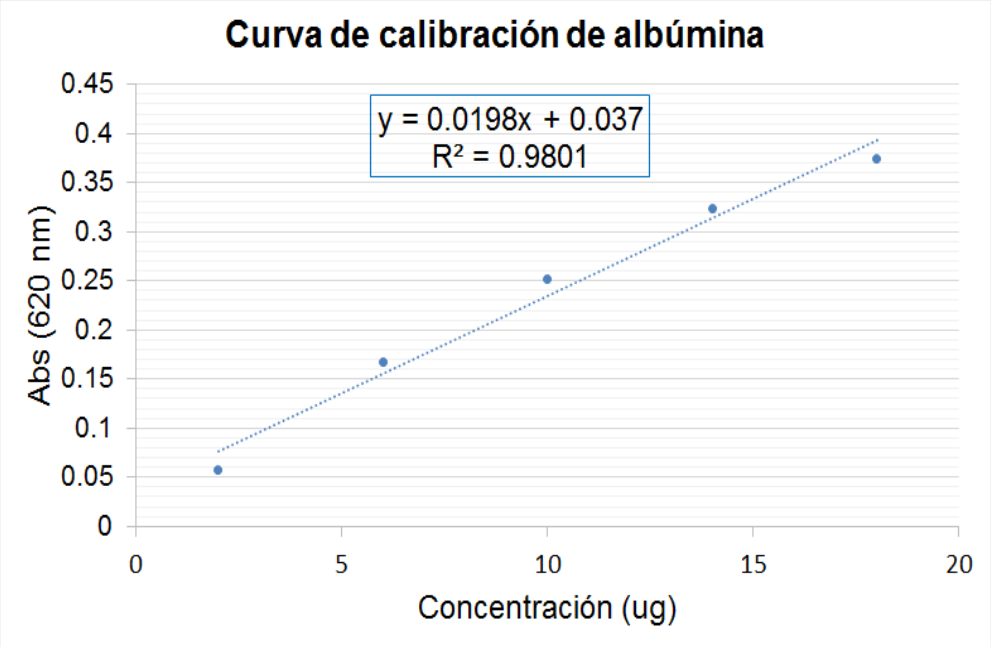
50 mM NaH_2PO_4

300 mM NaCl

300 mM Imidazol

0.1 mM PMSF

10.3 Anexo 3



Curva de calibración de albumina para la determinación de las proteínas totales. Se realizó el ajuste lineal obteniendo una ecuación de la recta y = 0.0198x + 0.037 y un coeficiente de correlación de 0.9801

10.4 Anexo 4

Gel de poliacrilamida al 12% en condiciones desnaturalizantes (PAGE-SDS)

Gel de corrimiento

Reactivo	Concentración final	10 mL al 12%
Agua destilada estéril	---	2.044 mL
Tris/HCl 1.5 M pH 8.8	0.564 M	3.76 mL
Acrilamida 29%/bis 1%	12%	4 mL
SDS 10%	0.1%	100 µL
Persulfato de amonio 10%	0.1%	100 µL
TEMED	1/1000	10 µL

Gel de concentrado

Reactivo	Concentración final	3 mL
Agua destilada estéril	---	2.21 mL
Tris/HCl 0.5 M pH 6.8	0.0625 M	375 µL
Acrilamida 29%/bis 1%	3.38%	350 µL
SDS 10%	0.1%	30 µL
Persulfato de amonio 10%	0.1%	30 µL
TEMED	1/1000	3 µL

Buffer de tratamiento reductor 4X

Reactivo	Concentración final
Glicerol	40%
SDS	8%
B-mercaptoetanol	20%
Tris/HCl 1 M pH 6.8	0.25 M
Azul de bromofenol	Adicionar unos granos hasta ver azul

Las muestras se diluyen con el buffer a 1X y se incuban en agua hirviendo por 5 minutos.

Buffer de corrimiento

Reactivo	Concentración/L
Tris-base	3.02 g
Glicina	14.4 g
SDS	1 g

El SDS se agrega al final y se agita suavemente. Guardar el buffer a 4 °C.

Western Blot

Tampón de transferencia (TT)

Reactivo	Concentración/L
Tris-base	3.02 g
Glicina	14.4 g
Metanol	200 mL
SDS	1 g

El SDS se agrega al final y se agita suavemente. Filtrar con papel filtro y guardar el buffer a 4 °C.

TBS-tween

Reactivo	Concentración
Tris-base	0.02 M pH 8
NaCl	0.15 M
Tween-20	

Ajustar el pH a 8 con HCl. Agregar el tween-20 al final y agitar suavemente. Guardar a 4 °C.

Solución de revelado y fijado

Ambas soluciones se preparan de los reactivos comerciales de revelado y fijado KODAK haciendo una dilución de 1/6.

Todas las soluciones se preparan con agua destilada desionizada y estéril.