



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

INSTITUTO DE CIENCIAS
CENTRO DE QUÍMICA-ICUAP
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS-BUAP

POSGRADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**“Producción y purificación de la LAPysplI recombinante
producida en la levadura *Pichia pastoris*,
estudio cinético y determinación de metales”**

TESIS

PRESENTADA PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS QUÍMICAS
ÁREA DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Presenta:

Q.F.B. Lorena Guadalupe Cardona Fuentes

Directoras de tesis

**Dra. Irma Pilar Herrera Camacho
Dra. Lourdes Millán Pérez Peña
LBBM-CQ-ICUAP**



BUAP

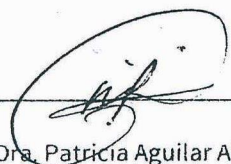
A QUIEN CORRESPONDA:

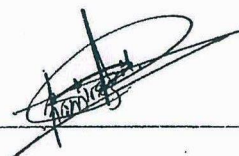
Por este conducto la Comisión Revisora formada por la Dra. Nora Hilda Rosas Murrieta, Dra. Patricia Aguilar Alonso, Dr. Alberto Ramírez Mata, y el Dr. José Luis Cerriteño Sánchez, informan haber leído y aprobado para su impresión, la tesis denominada **“Producción y purificación de la Lap yspII recombinante producida en la levadura *Pichia pastoris*, estudio cinético y determinación de metales”**, que presenta la alumna **Lorena Guadalupe Cardona Fuentes** para obtener el grado de Maestría en Ciencias Químicas.

Se extiende la presente a los veintisiete días del mes de noviembre del año dos mil diecisiete.

ATENTAMENTE


Dra. Nora Hilda Rosas Murrieta


Dra. Patricia Aguilar Alonso


Dr. Alberto Ramírez Mata


Dr. José Luis Cerriteño Sánchez

80 AÑOS
DE UNIVERSIDAD

Posgrado en Ciencias Químicas
Facultad de Ciencias Químicas
Instituto de Ciencias (ICUAP)

Edificio FCCQ 10,
Ciudad Universitaria
Col. San Manuel, Puebla, Pue. C.P. 72570
01 (222) 229 55 00 Ext. 7397
posgrado.quimica@correo.buap.mx

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

- Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, con el apoyo de beca otorgada por CONACYT para los estudios de maestría con el número de registro (CVU 696767).
- “Agradezco a la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado por el apoyo otorgado para la conclusión de esta tesis dentro del Programa II. Investigación y Posgrado. Aseguramiento de la calidad en el Posgrado. Indicador establecido en el Plan de Desarrollo Institucional 2013-2017”, con el número de apoyo (VIEP/3086/2017).

AGRADECIMIENTOS ACADEMICOS

La realización de este trabajo no hubiera sido posible sin el apoyo de las siguientes personas:

- Las Doctoras Irma Pilar Herrera Camacho y Lourdes Millán Pérez Peña, directoras de esta tesis, ya que sin su orientación, apoyo, dedicación, paciencia, consejos y ayuda no hubiera sido posible.
- A mi comisión de tesis, Dra. Nora Hilda Rosas Murrieta, Dra. Patricia Aguilar Alonso Dr. Jose Luis Cerriteño Sánchez y Dr. Alberto Ramírez Mata, por su paciencia y enseñanza, gracias por el tiempo dedicado a la revisión del presente trabajo y sus recomendaciones para la mejora del manuscrito.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

- Quisiera agradecer en primer lugar a Dios por acompañarme en este camino para la realización de este trabajo.
- A mis padres, en especial a mi madre por su enseñanza, su valor y esfuerzo, gracias por apoyar mis locuras e impulsarme a luchar por mis sueños, haciéndome ver que no todo es fácil pero con esfuerzo y sacrificio se pueden alcanzar, por darme alas para volar y por confiar en mí, aun cuando yo dude de mí, gracias también por tus consejos, tus desvelos y constantes preocupaciones. A mi papá, por su apoyo a través de estos años. A mi hermano gracias por ser mi amigo de vida y sangre, y al resto de mi familia que me apoya a mi abuela, tíos, primos, sobrinos los amo a todos.
- A Angie, Isa y Marco gracias por estar siempre para mí por escucharme y darme ánimos por tantos y tantos años aún en la distancia y en la no tan distancia, en especial en estos últimos meses que tan cuesta arriba se me han hecho, por apoyar mis locuras, ser mis cómplices de vida los quiero mucho.
- A mis amigos del posgrado y del laboratorio: Olaf, Paty, Getulio, Dalia, Migue, Liz, Érica y en especial a las siguientes personas: Marbeth por decirme que soy como un virus y que aun así estas para apoyarme desde el inicio de nuestra travesía, a Nacho por la huella académica y de vida que dejaste, por preocuparte por mi salud y estar más loco que yo, así como las risas y anécdotas que nunca faltaron, a Delfino por secundar todas mis locuras y apoyarme aun cuando ya no podía, a Lisset, por tus pláticas, consejos, y cafés, a Julio por su apoyo académico antes y durante el posgrado, al Dr. José Luis por tu apoyo y excelentes pláticas, a Lupita por tu apoyo dentro y fuera de laboratorio y en general a todos ellos por aguantarme, aun a pesar de ser tan latosa e inquieta, aún para los estándares de la ciencia. Gracias por las aventuras, risas, viajes y planes que nunca faltaron, por esas anécdotas que se dijeron y las que se quedaron guardadas, por estos años que han estado ahí y espero continúen los quiero en gran manera, gracias por todo.

- A Lili y Aurorita por su ayuda al resolver cuantas dudas administrativas se me plantearon.
- A la Dra. Lidia y Sandra por creer en mí e introducirme en el mundo de la Ciencia para lograr esta meta, por sus pláticas, cafés y apoyo las quiero.
- A la Dra. Laura, Garate, por su apoyo académico y moral.

Y a cada persona que intervino en la realización de esta tesis mi eterno agradecimiento

¿La ciencia ha prometido la felicidad? No lo creo.
Ha prometido la verdad y la cuestión es saber si con la verdad
Se conseguirá algún día la felicidad
Emilé Zola.

ÍNDICE

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
1.1. PROTEÓLISIS	2
1.2. SEÑALES QUÍMICAS PARA EL RECAMBIO	3
1.2.1. <i>Ubiquitinación</i>	4
1.2.2. <i>Residuos Oxidados</i>	4
1.2.3. <i>Secuencias PEST</i>	5
1.2.4. <i>Ciclinas</i>	5
1.2.5. <i>Residuos N-terminales</i>	5
1.2.6. <i>Pentapéptido KFERQ</i>	6
1.2.7. <i>Mecanismo general de la proteólisis</i>	6
1.3. CLASIFICACIÓN DE LAS PROTEASAS	7
1.4. LA FAMILIA LEUCIN AMINOPEPTIDASA (LAPs).....	8
1.5. <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	10
1.5.1. <i>Sistema proteolítico de Schizosaccharomyces pombe</i>	12
1.6. PROTEÍNAS RECOMBINANTES	12
1.7. SISTEMAS DE EXPRESIÓN.....	13
1.8. <i>Pichia pastoris</i>	14
1.9. EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS HETERÓLOGAS EN <i>Pichia pastoris</i>	16
1.10. PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES.....	18
1.11. CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD POR METALES INMOVILIZADOS (IMAC).....	19
2. ANTECEDENTES	21
3. JUSTIFICACIÓN	23
4. OBJETIVOS.....	24
4.1. OBJETIVO GENERAL	24
4.1.1. <i>Objetivos particulares</i>	24

5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
5.1. DIAGRAMA DE TRABAJO.....	25
5.2. SOBREPDUCCIÓN DE LAPYSPII RECOMBINANTE	26
5.3. PRECIPITACIÓN POR SALADO CON SULFATO DE AMONIO (NH₄)₂SO₄.....	26
5.4. CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD IMAC (NTA-Ni)	27
5.5. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES.....	29
5.6. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.....	30
5.7. CONCENTRACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA PAGE-SDS.....	32
5.7.1. Precipitación de proteínas con acetona	32
5.7.2. Liofilización	32
5.8. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES (PAGE-SDS).....	33
5.9. WESTERN BLOT (INMUNOBLOTTING)	35
5.10. DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS CINÉTICOS.....	36
5.11. DETERMINACIÓN DE METALES POR EL MÉTODO DE PIXE.....	37
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	38
6.1. CEPA PRODUCTORA DE LAPYSPII (PpX33-LAPII).....	38
6.2. DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE CRECIMIENTO DE LA CEPA PRODUCTORA DE LAPYSPII (X33-LAPII) EN METANOL	39
6.3. CONDICIONES ÓPTIMAS DE PRODUCCIÓN DE LA LAPYSPII CON METANOL COMO INDUCTOR	40
6.4. PRESENCIA DE LA LAPYSPII DURANTE EL CRECIMIENTO CON METANOL COMO INDUCTOR	42
6.5. PURIFICACIÓN DE LA LAPYSPII RECOMBINANTE POR CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD POR INMOVILIZACIÓN DE IONES (IMAC-Ni-NTA).....	43
6.6. DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS CINÉTICOS DE LA LAPYSPII RECOMBINANTE.....	49
6.7. DETERMINACIÓN DE METALES POR EL MÉTODO DE PIXE	52
7. CONCLUSIONES.....	54

8. PERSPECTIVAS DEL TRABAJO.....	54
9. BIBLIOGRAFÍA.....	55

ÍNDICE DE FIGURAS

No. de figura		Página
1.	Rompimiento de un enlace peptídico por ataque nucleofílico	7
2.	Leucin aminopeptidasa, hidrolisis N-terminal de un polipéptido	8
3.	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	10
4.	Proceso de división mitótica y proceso de conjugación en <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	11
5.	<i>Pichia pastoris</i>	15
6.	Vector de expresión usado en la expresión de proteínas en <i>Pichia pastoris</i> e integración al cromosoma para la producción de la proteína de interés	17
7.	Modelo de la interacción entre la etiqueta de histidinas y el Ni ²⁺	19
8.	Modelo in-sílico de la LAPypII	22
9.	Inserción del ORF de LAPypII en el genoma de <i>P. pastoris</i>	38
10.	Curva de crecimiento celular de la cepa productora de LAPypII con metanol como fuente de carbono	40
11.	Actividad enzimática de la LAPypII a lo largo del crecimiento celular de la cepa productora con metanol como fuente de carbono	41
12.	Presencia de la LAPypII recombinante en los diferentes días de crecimiento con metanol	42
13.	Perfil de elución de la LAPypII recombinante por cromatografía de afinidad por metales inmovilizados Ni-NTA a partir del concentrado por precipitación (80% saturación de sales) del extracto libre de células.	45
14.	Concentración de proteínas y actividad enzimática en las diferentes etapas del IMAC	46
15.	Presencia de la LAPypII recombinante	47
16.	Cinéticas de reacción enzimáticas	49
17.	Curvas de saturación de la proteína LAPypII recombinante	50
18.	Representación de Lineweaver-Burk	51
19.	PAGE-SDS de la proteína LAPypII recombinante para cuantificar el metal por el método de PIXE	53

ÍNDICE DE TABLAS

No. de tabla		Página
1.	Clasificación de enzimas proteolíticas según el NC-IUBMB	8
2.	Proteínas recombinantes expresadas en diferentes levaduras	13
3.	Levadura <i>Pichia pastoris</i> como un sistema de expresión para diferentes proteínas	16
4.	Componentes de la reacción para determinar la actividad enzimática	30
5.	Etapas de purificación de la LAPyspII recombinante y rendimiento	48
6.	Parámetros cinéticos de la LAPyspII recombinante y LAPyspII nativa	51

RESUMEN

Las LAPs pertenecen a las familias M1 y M17 constituyen un grupo de metalopeptidas dependientes del ión zinc y/o manganeso. Poseen funciones diversas como la inactivación de polipeptidasas, regulación de la meiosis así como en parásitos se propone como blanco terapéutico para una posible vacuna. En nuestro laboratorio en 2007 se puso en evidencia una nueva exopeptidasa citosólica en la levadura *Schizosaccharomyces pombe*, denominada Leucín-aminopeptidasa yspII (**LAPyspII**), es dependiente de Mn^{2+} , pertenece a la familia M17, es una proteína hexamérica de 320 KDa, con monómeros de 54 KDa. Aún no se conoce si tiene Zn^{2+} y/o Mn^{2+} en su sitio activo. Para avanzar en la caracterización molecular, se obtuvo una cepa productora de la LAPyspII en la levadura *Pichia pastoris* (PpX33-LAPII) donde al gen de la alcohol oxidasa (AOX1) del cromosoma de la cepa X33, se le insertó el ORF del gen *ape2*, el ORF cuenta con un factor α , que codifica para una secuencia señal que le permita a la proteína ser expulsada al medio extra celular, también cuenta con un motivo de 6 histidinas (his-6x) lo que facilita su purificación e identificación por western-blot. El gen *ape2* se insertó por desplazamiento del gen AOX1, teniendo así un fenotipo Mut+, esto quiere decir que cuando se pone la cepa en presencia de metanol como fuente de carbono, se enciende el gen AOX1 para su crecimiento y sobreexpresión de la LAPyspII.

El objetivo del presente trabajo de tesis es producir la LAPyspII recombinante en *Pichia pastoris* purificarla por cromatografía de afinidad por inmovilización de metales (IMAC), determinar los parámetros cinéticos, así como también la determinación de metales en su estructura por el método de PIXE.

Se obtuvo que al día 4 de crecimiento con metanol se encuentra la mayor producción de enzima en el medio libre de células. Se concentró la LAPyspII recombinante precipitando con sulfato de amonio al 80% de saturación, trabajando de esta forma con la estructura monomérica, se purificó en una sola etapa con la resina de IMAC-NTA- Ni^{2+} , eluyendo con 600mM de imidazol en dos etapas con NaCl (0.5 y 1M), obteniendo un rendimiento de 35.1 % y un factor de purificación de 3.68. El análisis electroforético de PAGE-SDS y Western-blot de la fracción de elución muestra que se obtiene una preparación homogénea de alta pureza.

Con respecto al estudio cinético observamos que la K_m de la LAPyspII recombinante es alrededor de 10 veces menor en comparación con la LAPyspII nativa es decir que la recombinante tiene mayor afinidad, sin embargo la recombinante presenta valores menores de V_{max} , así como de la constante de velocidad de recambio k_p lo que nos indica que la recombinante es más lenta en la segunda etapa donde el sustrato se transforma a producto. Al determinar la eficiencia cinética (k_p/K_m) los valores son similares tanto de la LAPyspII recombinante ($3.4 \times 10^6 M^{-1}s^{-1}$) como de la nativa ($6.6 \times 10^5 M^{-1}s^{-1}$), lo que nos permite concluir que son parecidas en su eficiencia cinética tanto en la estructura hexamérica de la LAPyspII nativa como en la estructura monomérica de la LAPyspII recombinante.

Por último dado que la LAPyspII es una enzima dependiente de manganeso, para avanzar en la estructura molecular y el mecanismo cinético de la enzima es importante conocer el metal (Mn^{2+} y/o Zn^{2+}) de la LAPyspII. Se utilizó el método de Pixe, siendo un método de rayos X no destructivo y se puede hacer a partir de la proteína en los geles de poliacrilamida. Se envió (29-agosto) el gel deshidratado con diferentes concentraciones de la LAPyspII recombinante al Instituto de Física de la UNAM con el Dr. José Luis Ruvalcaba, pero debido al mantenimiento del equipo y fenómenos naturales estamos en espera de los resultados.

1. INTRODUCCIÓN

El término proteína deriva del griego "proteos" (lo principal) y habla de su gran importancia para los seres vivos, constituyen el 50% del peso seco de la célula (15% del peso total) por lo que representan la categoría de biomoléculas más abundante después del agua¹. Sin embargo su importancia reside en su versatilidad y abundancia, puesto que las proteínas están involucradas en todos los procesos celulares. Las proteínas son las moléculas estructuralmente más complejas y funcionalmente más sofisticadas que se conocen. La estructura y las propiedades químicas de cada una se han ido desarrollando y afinando a lo largo de miles de millones de años de historia evolutiva, bajo esta perspectiva las enzimas proporcionan las intrincadas construcciones moleculares que facilitan la gran cantidad de reacciones químicas de una célula².

Por lo anterior, las proteínas están en un constante recambio dentro de las células; su síntesis y degradación están controladas de manera específica, para mantener un equilibrio dentro de la célula³. La degradación por proteasas constituye el proceso regulador que determina el nivel o concentración de una proteína en algún momento dado del ciclo celular, además de ser un mecanismo fundamental para el control postraduccional de un gran número de productos celulares⁴.

1.1. Proteólisis

La proteólisis es un proceso catabólico efectuado por enzimas proteolíticas y proteasas o péptidos hidrolasas, las cuales hidrolizan enlaces peptídicos de proteínas originando péptidos de menor tamaño o liberando aminoácidos, no requieren de coenzimas, aunque en ocasiones necesitan un ión metálico⁴. Este proceso se puede considerar como un mecanismo presente en todas las etapas de la vida celular y que regula la concentración de proteínas, que junto con los mecanismos de control transcripcional y traducción de proteínas; mantienen en equilibrio en cuanto a la producción y degradación de las mismas⁵.

Las proteasas inician, modulan y terminan una amplia gama de funciones celulares importantes que conllevan al procesamiento de moléculas bioactivas, por tanto directamente controlan

procesos biológicos esenciales, tales como: la replicación del ADN, la progresión del ciclo celular, la proliferación celular, la morfogénesis y remodelación de los tejidos, la extensión neuronal, la hemostasia, la cicatrización de heridas, la inmunidad, la angiogénesis y la apoptosis⁶. En 1942, Rudolf Schoenheimer determinó que la proteólisis es importante para mantener concentraciones constantes de proteínas⁷. La proteólisis está involucrada en varios procesos como: la regulación de la actividad de factores de transcripción, la presentación antigénica por el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC I), el ciclo celular, el ciclo lítico del bacteriófago λ , el desarrollo embrionario y las rutas de señalización celular como la que conduce a la apoptosis⁸. Los mecanismos de la proteólisis no sólo son responsables del recambio proteico, la regulación de la homeostasis celular o la supervivencia sino también del envejecimiento celular ya que estos mecanismos se ven afectados en etapas finales del ciclo de vida celular y esto se debe que a nivel genético estos mecanismos están controlados y regulados por sistemas proteolíticos que contribuyen inevitablemente, a la biología del envejecimiento⁹.

El “recambio proteico” es la base de la proteólisis propuesta por Schimke y Doyle en 1970, el cual permite que se conserve la concentración intracelular de las proteínas¹⁰. En las levaduras, la vacuola es el principal sitio de recambio proteico, capaz de reclutar numerosas proteínas por macrofagia (mecanismo del recambio del material citoplasmático cuando ocurre una disminución de nutrientes) o en distintas vías¹¹, como la ruta de transporte retrogrado del citoplasma a la vacuola (Ruta CTV)¹².

1.2. Señales químicas para el recambio

La degradación selectiva de proteínas es vital en todos los organismos, por lo que las moléculas deben mostrar secuencias o estructuras para ser reconocidas como señales de degradación por el sistema proteolítico¹³.

Las tasas de recambio de las distintas proteínas varían hasta 1000 veces, mientras que las diferencias de estabilidad de las proteínas, medidas según la desnaturalización, pueden ser mucho menores. 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 KFERQ¹⁴, estas señales funcionan como señal de envío al lisosoma frente a la disminución de nutrientes¹⁵.

1.2.1. 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, que condensa los residuos de glicina del extremo C-terminales de la ubiquitina con grupos amino de lisina de la proteína a marcar. Estas proteínas modificadas se degradan poco después por un complejo proteolítico (proteosoma 26S) que reconoce al marcador ubiquitina¹⁴. El sistema ubiquitina proteasoma (UPS), es altamente dinámico y consiste en ubiquitinación y desubiquitinación que modulan la estabilización y degradación de proteínas, ha surgido como un importante regulador del recambio proteico con la finalidad del mantenimiento de la homeostasis y viabilidad celular, presenta múltiples niveles de control de transcripción y traducción de genes para la degradación de proteínas innecesarias o de vida corta, esto gracias a que cuenta con diversos puntos de control y ciclos de retroalimentación para asegurar que la homeostasis proteica mantenga en equilibrio a la célula¹⁶.

1.2.2. Residuos Oxidados

Los residuos de aminoácido como la lisina, arginina y prolina son los más susceptibles a la oxidación, sin embargo los residuos que están alterados por oxidasas o por ataque de especies reactivas de oxígeno (ROS) promueven la degradación proteica, por las proteasas citosólicas¹⁴. Earl Stadtman y sus colaboradores han demostrado que muchas proteínas experimentan una oxidación en determinados residuos aminoácidos promoviendo condiciones que generan ROS¹⁷. Donde 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 celular¹⁴, así como en procesos inflamatorios, ya que con el aumento de ROS se

presenta el estrés oxidativo, el cual, puede desencadenar cambios mitocondriales, además, el exceso de suministro de nutrientes, que puede abrumar al ciclo de Krebs y a la cadena respiratoria mitocondrial, causando una disfunción, lo que puede conducir a la apoptosis celular¹⁸.

1.2.3. Secuencias PEST

Proteínas con una vida media menor de 2 horas, 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, ubicado en el extremo carboxilo que apunta a la proteína para su degradación¹⁹. Son muy pocas las proteínas de vida media larga que contienen estas regiones. Parece probable que las regiones PEST forman 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 ubiquitina²⁰.

1.2.4. Ciclinas

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, de una degradación muy controlada, dependiente de un paso previo de marcado de la ciclina con ubiquitina¹⁴. Algunas proteínas (ciclinas mitóticas) participan en la regulación del ciclo celular tienen una secuencia llamada caja de destrucción (RAALGNISN) que es reconocida por un dominio Ubiquitina Ligasa correspondiente²¹ y en casi todas las ciclinas se ha localizado esta secuencia señal formada por 9 aminoácidos que se encuentra presente entre los residuos 13 y 66 de la secuencia proteica²⁰.

1.2.5. 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 amino terminales tienen

una vida más prolongada¹⁴, este extremo es la primera parte de una proteína que sale del ribosoma durante la síntesis proteica, contiene, generalmente, secuencias que actúan como señales de destino intracelular, que permite la entrega de la proteína en el lugar designado²².

1.2.6. 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 secuencias¹⁴, Como sucede con la proteólisis lisosómica, que se caracteriza por la selección selectiva de proteínas que están bioquímicamente relacionadas con este pentapéptido KFERQ, debido a que es esencial para mantener la homeostasis celular y la supervivencia mediante la degradación selectiva de proteínas citosólicas mal plegadas, oxidadas o dañadas²³.

1.2.7. Mecanismo general de la proteólisis

Las proteasas tiene la función de hidrolizar enlaces peptídicos (figura 1). Es por ello que el mecanismo más común es la polarización del enlace peptídico por un ataque nucleofílico sobre el enlace carbono-oxígeno (regulado por una molécula de agua) asistido por la donación de un protón al nitrógeno peptídico. En las enzimas proteolíticas, varios residuos de aminoácidos toman la función de nucleofilos y otros actúan como donadores de protones.

Por lo cual una proteólisis es una reacción irreversible y exergónica, con lo cual no se aporta energía salvo cuando es específica²⁴.

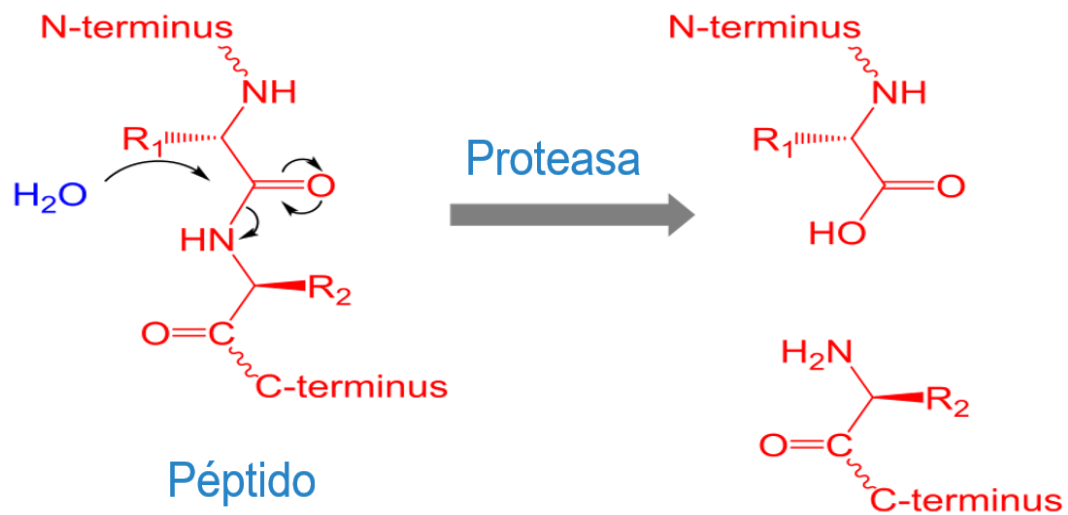


Figura 1. Rompimiento de un enlace peptídico por ataque nucleofílico
 Tomado y modificado Sergey, 2014²⁵.

1.3. Clasificación de las proteasas

Las proteasas también llamadas peptidasas se clasifican de manera general en dos grupos principales:

- Endoproteasas: Actúan sobre enlaces peptídicos internos de proteínas y péptidos.
- Exoproteasas: Actúan sobre enlaces peptídicos externos de péptidos y proteínas y se subclasifican en carboxipeptidasas las cuales actúan removiendo aminoácidos del extremo C- terminal y las aminopeptidasas, actúan sobre el extremo N-terminal de péptidos y proteínas²⁶.

Una clasificación complementaria y más específica fue propuesta por el Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (NC-UIBMB), y está basada en los residuos del sitio activos e inhibidores, teniendo 4 grandes familias (tabla 1).

Tabla 1. Clasificación de enzimas proteolíticas según el NC-IUBMB

Familia	Proteasa representativa	Aminoácidos del sitio activo	Inhibidores característicos
Serín proteasas I	Quimiotripsina	Asp ¹⁰² , Ser ¹⁹⁵ e His ⁵⁷	DFP, PMSF y TLCK
Serín proteasas II	Subtilisina	Asp ³² , Ser ²²¹ e His ⁶⁴	DFP, PMSF y TLCK
Cisteín proteasa	Papaína	Cis ²⁵ , His ¹⁵⁹ e Asp ¹⁵⁸	Iodoacetato, PCMB, PHMB, N-etilmaleimada, E 64
Aspártico proteasas	Penicilopepsina	Asp ³³ y Asp ²¹³	Pepstatina A
Metaloproteasas I	Carboxipeptidasa A bovina	Zn, Glu ²⁷⁰ y Tyr ²⁴⁸	EDTA, EGTA, 1-10 fenantrolina y cloroquina
Metaloproteasas II	Termolisina	Zn, Glu ¹⁴³ e His ²³¹	EDTA, EDTA, 1-10 fenantrolina y cloroquina

1.4. La familia Leucin aminopeptidasa (LAPs)

Las Leucin aminopeptidasas (LAP E.C.3.4.11-X) son exopeptidasas que cataliza la hidrólisis principalmente de la leucina del extremo amino terminal de las cadenas polipeptídicas²⁷ (figura 2).

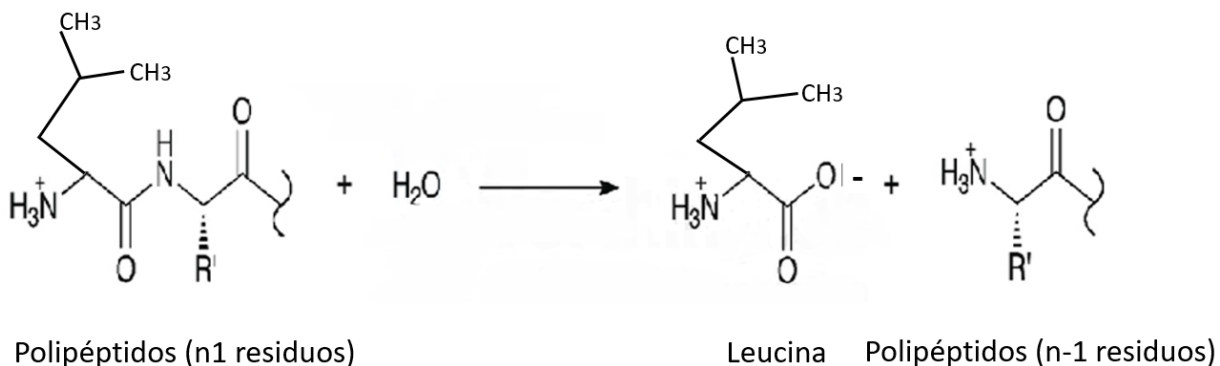


Figura 2. Leucin aminopeptidasa, hidrólisis N-terminal de un polipéptido
Tomado y modificado de Worthington Biochemical Corporation²⁸.

Las LAPs pertenecen a las familias M1 y M17, constituyen un grupo de metalopeptidasa ubicuas, dependientes del ión zinc, que cataliza la remoción de residuos de leucina de proteínas y péptidos. Además, tienen distintas especificidades de sustrato²⁹. Estas enzimas fueron las primeras proteasa descubiertas en tejidos de animales y un gran número ha sido caracterizado. Las metaloaminopeptidasas son hidrolasas donde el ataque nucleofílico del enlace peptídico esta mediado por una molécula de agua que es activada por un catión metálico divalente como Zn^{2+} , Co^{2+} y/o Mn^{2+} , algunas LAPs requieren un único ion metálico, mientras que otras requieren dos iones metálicos. Los ligandos metálicos son los residuos His, Glu, Asp o Lys.^{29,30}

Las LAPs están ampliamente distribuidas, son ubicuos en la naturaleza, se encuentran en todos los organismos desde bacterias hasta humanos y plantas, tienen funciones muy diversas y específicas, algunos ejemplos son:

- La LAP del cristalino bovino pertenece a la familia M17, es hexamérica, tiene dos sitios de unión a dos iones Zinc para la catálisis, los bajos niveles de LAP durante la maduración y el envejecimiento se ha relacionado con la formación de cataratas, debido a la acumulación de proteínas no degradadas, presenta una K_m de $7.3 \mu M$ y una V_{max} $4.6 \text{ nmoles /h}^{-1}$ ³¹.
- La LAP-N en humanos, pertenece a la familia M1, es una proteína dependiente de Zn^{2+} , es importante para la inactivación de polipeptidasas de transmisión sanguínea como las encefalinas, y la interleucina 8³².
- La LAP de *Fasciola gigantica*, pertenece a la familia M17, es una proteína manganeso dependiente, está presente en todas las etapas de crecimiento de este parásito, por lo cual se propuso como blanco para una posible vacuna³³.
- La LAP de *E. Coli*, pertenece a la familia M17, es una proteína dependiente de Zn^{2+} , comprende dos enzimas a PepA y la PepB, las cuales sirven como aminopeptidasas y como proteínas de unión al DNA que regulan tanto la recombinación sitio especifica como el control transcripcional^{34,35}.
- La LAP del hongo *C. cinereus*, pertenece a la familia M1, y tiene una relación entre los iones de Mg^{2+} , también se ha implicado en el desarrollo meiotico³⁶.

1.5. *Schizosaccharomyces pombe*

Schizosaccharomyces pombe (*S. pombe*) pertenece al reino de los hongos, es un ascomiceto o basidiomiceto unicelular predominante en su ciclo de vida, generalmente caracterizados por dividirse asexualmente, no tienen estructuras productoras de esporas, presenta forma bacilar, es no patógeno, que se reproduce de manera asexual por fisión binaria³⁷. Es genéticamente distante de la levadura de gemación *Saccharomyces cerevisiae*, el linaje de *Schizosaccharomyces* se separó hace 330 a 420 millones de años para formarse una rama ancestral denominada arqueascomicetos^{38,39}. Fue aislada por primera vez de la cerveza de mijo proveniente del este de África en 1893 por Linder⁴⁰. Se cultivan como células haploides y/o diploides. Son células cilíndricas de 3 a 4 μm de diámetro y de 7 a 15 μm de largo en estado haploide; 4 μm a 5 μm de diámetro y 10 a 25 μm de largo en estado diploide, pueden reproducirse por dos vías una mitótica o vegetativa y otra meiótica y esporulación^{41,42} (figura 3).



Figura 3. *Schizosaccharomyces pombe*
Tomado Stevan 2012⁴³.

Esta levadura se reproduce normalmente siguiendo un ciclo celular eucariota con fase G1, S, G2 y M. *Schizosaccharomyces pombe* puede seguir una división mitótica, pero bajo ciertas condiciones, dos células haploides pueden sufrir un proceso de fusión para formar una célula diploide. Este proceso ocurre entre dos células de tipo sexual opuesto, donde intervienen un tipo de Proteínas de bajo peso molecular, conocidas con el nombre de feromonas. Las células de tipo

sexual opuesto y que concluyen en el proceso de apareamiento o conjugación, donde el resultado es la formación de una célula diploide, que puede multiplicarse por división mitótica o sufrir meiosis y posteriormente, el proceso de esporulación, dando lugar a esporas haploides que germinan en las condiciones adecuadas, para completar el apareamiento (figura 4).

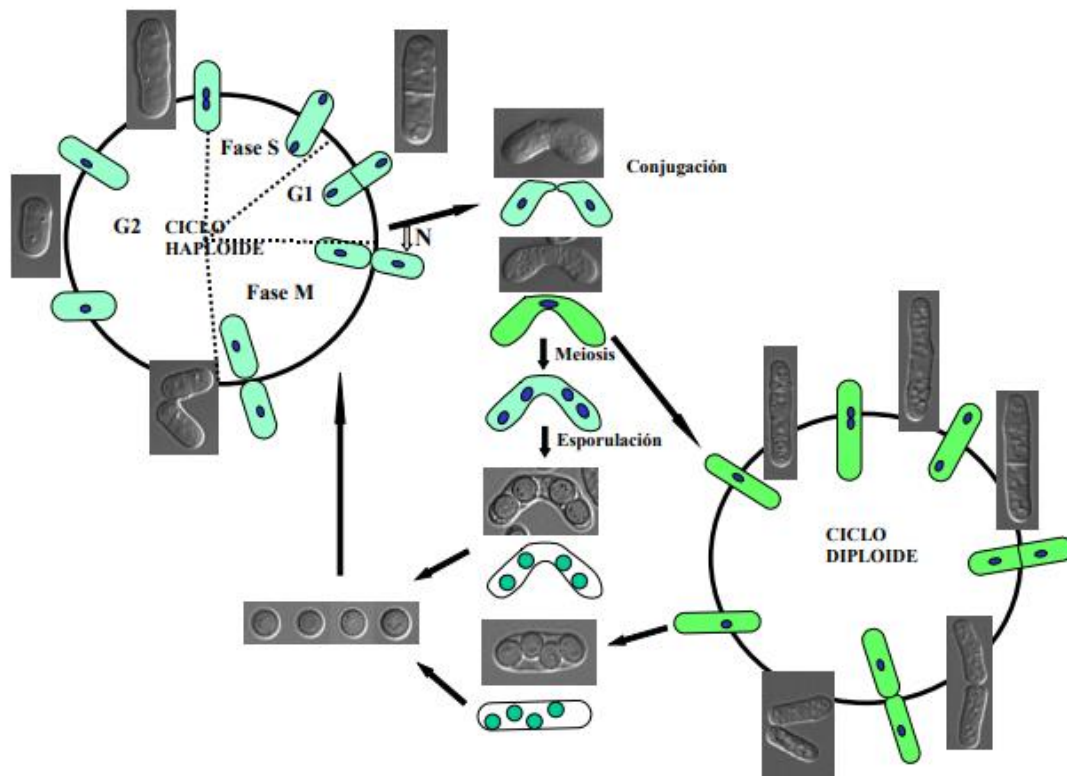


Figura 4. Proceso de división mitótica y proceso de conjugación en *Schizosaccharomyces pombe*. Tomado de Regidor 2001⁴⁴.

Schizosaccharomyces pombe, en condiciones normales, es capaz de crecer siguiendo el ciclo mitótico, pero cuando ambos tipos sexuales se encuentran en cultivo y existe un agotamiento de los nutrientes, estas células pueden abandonar el ciclo mitótico y conjugarse dando lugar a un diploide inestable, debido a que sufre inmediatamente un proceso de esporulación, dando lugar a cuatro ascosporas haploides de 1-2 μ de diámetro que en las condiciones adecuadas, darán lugar a cuatro células haploides.

S. pombe presenta dos tipos sexuales reconocidos como P o h⁺ y M o h⁻, definidos por el locus mat1. Las células haploides, que presentan el segmento denominado mat1-P en dicho locus, con los genes mat1-Pc y mat1-Pm, pertenecen al tipo sexual P o h⁺ y las que presentan el mat1-M, que codifica los genes mat1-Mc y mat1-Mm, son M o h⁻. Los genes mat1-Pc y mat1-Mc son imprescindibles para la expresión de las feromonas y sus receptores, la expresión de todos los genes mat1 es necesaria para llevarse a cabo el proceso de esporulación^{44, 45}.

1.5.1. Sistema proteolítico de *Schizosaccharomyces pombe*

En la levadura de fisión *S.pombe* la información de las proteasas es limitada, se han descrito 8 enzimas intracelulares proteolíticas: dos endoproteínas yspA y yspB, una carboxipeptidasa, una aminopeptidasa yspI, una dipeptidilaminopeptidasa yspI, una leucinaminopeptidasa yspII y dos complejos proteolíticos, la peptidasa multicorn y el proteosoma 26S^{46, 47}.

La Leucín aminopeptidasa yspII es motivo de éste trabajo por lo que la mencionamos más adelante en los antecedentes.

1.6. Proteínas recombinantes

La biotecnología está implicada en la producción de las proteínas recombinantes a partir de diversas fuentes naturales como plantas, animales o microorganismos. También gracias a la ingeniería genética estas proteínas recombinantes se pueden modificar antes de su producción. Así, se les pueden poner etiquetas que las identifiquen y/o faciliten su purificación, y también se pueden fusionar con proteínas reporteras para su fácil detección⁴⁸. Para la expresión de estas proteínas recombinantes, se utilizan diversos vectores, actualmente el uso de estas proteínas recombinantes es una tecnología avanzada ya que con los métodos de cDNA y PCR apropiados, los vectores de expresión pueden construirse rápidamente, donde después de la determinación de la secuencia de las construcciones, los vectores se introducen en el huésped (sistema de expresión) obteniendo cepas productoras de la proteína de interés⁴⁹.

Actualmente se ofrecen en el mercado una variedad de proteínas de origen recombinante con una cantidad importante de aplicaciones. La lista se incrementa día a día, lo cual impulsa el mercado biotecnológico e implica un interés comercial en la investigación en este campo⁵⁰.

Tabla 2. Proteínas recombinantes expresadas en diferentes levaduras⁵².

CEPA.	PROTEÍNA.
<i>S. cerevisiae.</i>	IFN- α IFN- γ HbsAg Insulina EFG Humano Huridina.
<i>P. pastoris.</i>	HbsAg EFG Humano TNF Humano IL-2 HIV gp120 HSA Anticuerpos.
<i>S. pombe.</i>	Factor XIIIa Antitrombina III

En la tabla 2, se muestran algunas proteínas recombinantes que han sido expresadas en distintos tipos de cepas pertenecientes a diferentes levaduras. Por ello, las estrategias de purificación para obtener a las proteínas recombinantes en concentraciones altas deben ser elaboradas para cada caso en particular. El hecho de tener la proteína purificada a homogeneidad da pauta para estudios más finos ya sea a nivel estructural como la cristalografía de proteínas, la cuantificación de metales, así como a nivel funcional en la generación de anticuerpos y el mapeo *in vitro* de interacciones proteína-proteína^{51 52}.

1.7. Sistemas de expresión

Un sistema de la expresión son células adaptadas a sobreproducir una proteína recombinante a partir de un gen foráneo. Para ello los hospederos son de dos categorías: los sistemas procariótico y sistemas eucarióticos. Los sistemas procariotas generalmente son más sencillos de manipular y satisfactorios para la mayoría de los procesos. No obstante, hay diferentes

limitaciones al emplear células procariotas en la producción de proteínas eucariotas debido a que muchas de ellas requieren para ser biológicamente activas, de una variedad de modificaciones postraduccionales, tales como un correcto plegamiento, glicosilación, fosforilación, formación de puentes disulfuro, etc., por ello los sistemas eucarióticos como las levaduras, como *Pichia pastoris*, *S.pombe* y *S. cerevisiae*, ya han sido ampliamente descritas como sistemas de expresión eficientes para la producción de proteínas recombinantes eucariotas^{53, 54}.

1.8. *Pichia Pastoris*

La levadura *Pichia pastoris* (figura 5), también llamada *Komagataella pastoris*, es una especie de levadura metilotrófica (capaz de crecer en metanol como única fuente de carbono), se utiliza con frecuencia como un sistema de expresión para la producción de proteínas. Tiene una alta tasa de crecimiento, también cuenta con la capacidad de crecer en un medio simple y económico, por ello se vuelve adecuada para la producción a pequeña y gran escala. Esta levadura es similar a la bien estudiada *Saccharomyces cerevisiae* con condiciones de crecimiento y tolerancias similares⁵⁵. Es utilizada tanto para investigación básica como para fines industriales, debido a su fácil manipulación genética, a los altos niveles de producción de la proteína de interés, la habilidad de realizar modificaciones postraduccionales similares a las de los organismos eucariontes superiores (glicosilación, puentes disulfuro y procesamiento proteolítico) que generan un plegamiento correcto de la proteína.



Figura 5. *Pichia pastoris*
*Tomada y modificada Nature Biotechnology*⁵⁵.

Esta levadura como sistema de expresión cuenta con una amplia gama de vectores con diferentes características de sobreproducir la proteína de interés. Emplea vectores de integración, es decir para que el gen de interés pueda ser integrados al cromosoma de la levadura; en estos vectores se puede integrar un factor que señala a las proteínas recombinantes para ser expulsadas al medio libre de células, lo que facilita su posterior purificación⁵⁵.

La producción de proteínas recombinantes en la levadura *Pichia pastoris* tiene grandes ventajas sobre otros sistemas de expresión procariontas y eucariotas: 1. Tasa de crecimiento rápido, acoplado a una fácil fermentación celular de alta densidad, por la generación de biomasa; 2. Altos niveles de expresión en un medio casi libre de proteínas, debido a la integración de etiquetas como el α factor; 3. Eliminación de la contaminación con endotoxinas y bacteriófagos; 4. Fácil manipulación genética y disponibilidad para la caracterización de vectores de expresión de levaduras; 5. El desconocimiento de patogenicidad humana; 6. Puede realizar diversas modificaciones postraduccionales que incluyen: plegamento del polipéptido, glicosilación, metilación, acilación, regulación proteolítica y orientación a los espacios subcelulares; 7. La capacidad de secretar proteínas que pueden ser purificadas en el medio de cultivo libre de células.

Como ejemplos tenemos que *P. pastoris* se ha utilizado para la producción de diversas proteínas recombinantes de interés, como las que se muestran ⁵⁶ (tabla 3).

Tabla 3. Levadura *Pichia pastoris* como un sistema de expresión para diferentes proteínas⁵⁶.

Expression systems	No.	Protein	Species	PDB code
Yeast <i>Pichia Pastoris</i>	1	Kv1.2 with β subunit	<i>Drosophila melanogaster</i>	2A79
	2	Kv1.2-Kv2.1 paddle	<i>Rattus norvegicus</i>	2R9R
	3	Kv2.1paddle-Kv1.2 (F233 W)	<i>Rattus norvegicus</i>	3LNM
	4	Kir2.2 Inward-Rectifier	<i>Gallus gallus</i>	3JYC
	5	GIRK2 (Kir3.2) channel	<i>Mus musculus</i>	3SYO
	6	K ₂ p1.1 (KWIK-1)	<i>Homo sapiens</i>	3UKM
	7	K ₂ p4.1 (TRAAK)	<i>Homo sapiens</i>	3UM7
	8	Calcium release-activated calcium channel	<i>Drosophila melanogaster</i>	4HKR
	9	SoPIP2;1	<i>Spinacia oleracea</i>	1Z98 2B5F
	10	HsAQP5	<i>Homo sapiens</i>	3D9S

1.9. Expresión de proteínas heterólogas en *Pichia pastoris*

La presencia de metanol es esencial para obtener altos niveles de transcripción del gen foráneo, ya que este es el único inductor para los sistemas de expresión en *P. pastoris*, basados en el gen AOX1 y su concentración tiene un importante efecto en la producción de las proteínas heterólogas, donde la Alcohol Oxidasa I (AOX I) es indetectable en células cultivadas en medios con fuentes de carbono como glucosa. No obstante, esta enzima puede llegar a representar el 30% del total de las proteínas solubles de la levadura crecida en metanol. Estos hallazgos permitieron anticipar que la síntesis de la AOX I se podría regular a nivel transcripcional y que el promotor para el gen AOX1 podría ser útil para controlar la expresión de genes heterólogos. De manera el vector de expresión está bajo el control del promotor AOX los genes foráneos pueden encenderse o apagarse dependiendo de la fuente de carbono, así una fuente de carbono diferente al metanol reprime al promotor y una fuente de metanol, activa al

promotor, observándose el efecto en la expresión del gen heterólogo (figura 6). Además, un exceso de metanol podría afectar la eficiencia de transcripción del pAOX1 y la actividad metabólica celular. Ya que cuando las células son cultivadas con elevadas concentraciones de metanol se puede producir la acumulación a niveles tóxicos de formaldehído y Por lo tanto, un adecuado control de la concentración del metanol durante la etapa de inducción es un factor crucial para el éxito en la producción de las proteínas heterólogas⁵⁷. Por otra parte este mismo gen AOX1 favorece la integración por recombinación homóloga del vector linealizado al cromosoma, de dos maneras: por interrupción obteniendo un fenotipo Mut^S donde la levadura pierde su capacidad de crecer en metanol ó por desplazamiento obteniendo el fenotipo Mut⁺ donde la levadura crece en metanol (figura 6).

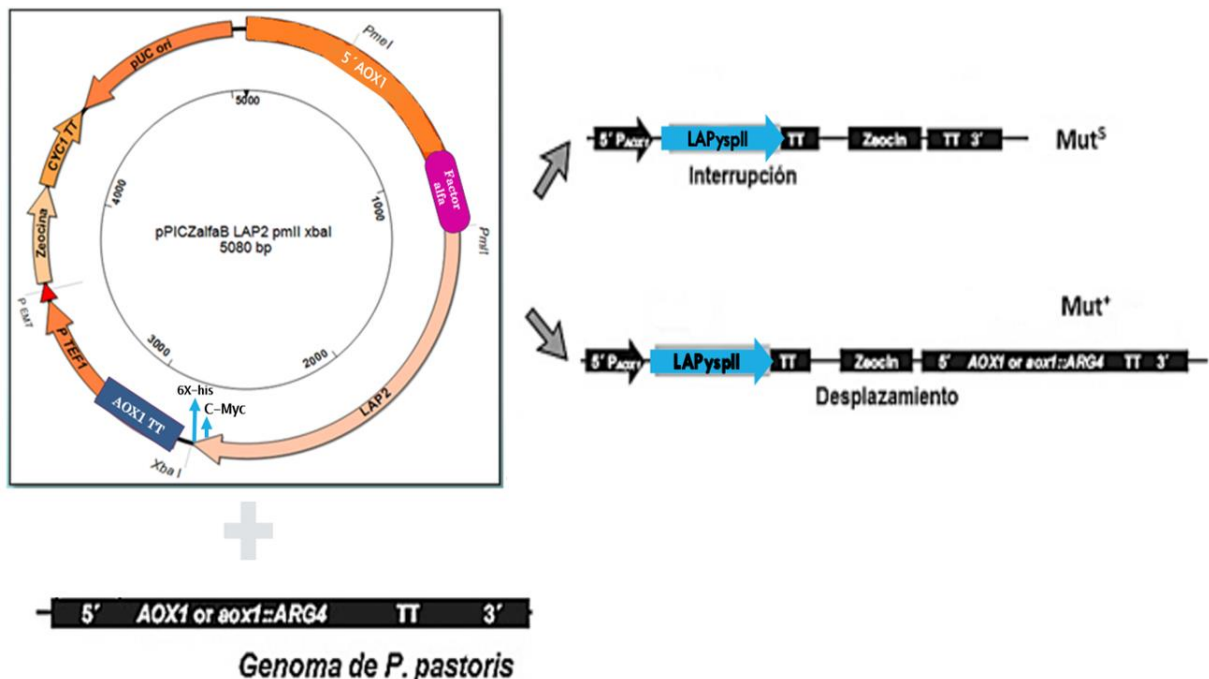


Figura 6. Vector de expresión usado en la expresión de proteínas en *Pichia pastoris* e integración al cromosoma para la producción de la proteína de interés. Tomado y modificado Invitrogen⁷¹.

Cabe mencionar que algunas Leucinas aminopeptidasas, expresadas de manera recombinante en *P. pastoris* pueden tener un impacto tanto en la industria como en la investigación. Por ejemplo lo que ocurre en el caso de una “Leucin aminopeptidasa” de *Aeromonas Proteolítica* (AAP), la cual es una proteína comercial (CAS Number: 37288-67-8), que también se usa para la investigación, donde la proteína fue inmovilizada sobre partículas sintéticas de doble

hidróxido (LDH) que contienen Mg^{2+} y Al^{3+} , obteniendo que la enzima no se intercala entre las capas de LDH, sino que se une a la superficie, permitiendo la catálisis de L -Leucina- p-nitroanilida, demostrando, que la AAP inmovilizada permanece disponible para el sustrato y conserva su actividad catalítica, mientras que los experimentos de reciclaje revelaron que las partículas de AAP / LDH se pueden recuperar y reutilizar varias veces sin una pérdida apreciable de actividad. Lo cual nos lleva a ver la importancia de la enzima LAPyspII, no solo para caracterizarla, si no contemplar que puede tener un impacto a nivel industrial⁵⁸.

1.10. Purificación de proteínas recombinantes

La purificación de proteínas requiere de métodos generales, sin embargo, cada proteína tiene características individuales, por lo que se han desarrollado protocolos y estrategias específicas. La producción de un gran número de proteínas recombinantes ha generado nuevas metodologías para mejorar la eficiencia y el rendimiento de la purificación^{59, 60}.

La introducción de etiquetas de afinidad es una herramienta importante para la purificación de proteínas recombinantes; su introducción a una proteína requiere la fusión de estas etiquetas a los extremos 3' y 5' de la proteína diana. Existen diferentes tipos de etiquetas de afinidad, como ejemplos tenemos: polihistidina (His 6X), Glutathione S-transferasa (GST), Maltosa-unión a proteína (MBP), Calmodulina-unión a un péptido (CBP), Hemaglutinina (HA), C-myc, FLAG. En el caso de la etiqueta de 6-histidinas (His 6X), la cual describiré a continuación, es la que se utilizó en este trabajo, debido a que es la etiqueta más utilizada, debido a su pequeño tamaño, a que rara vez interfiere en la función de la proteína, así mismo, la elución mediante gradiente de imidazol es poco agresiva, lo que permite preservar la inmunogenicidad de las proteínas, y es muy recomendable en purificaciones IMAC (Immobilized Metal Affinity Chromatography) generalmente con columnas de Ni^{2+} , o Cu^{2+} . Posteriormente ésta etiqueta también nos ayuda para identificar a la proteína por western-blot mediante anticuerpos primarios anti-polihistidina^{61, 62, 63}.

1.11. Cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (IMAC)

El concepto de IMAC fue inventando, así como probada su aplicabilidad por Porath en 1975⁶⁴. Se basó en la afinidad de metales de transición como Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} y Co^{2+} por la histidina y cisteína en soluciones acuosas. Esta idea se extendió-inicialmente la idea consistió en usar iones metálicos unidos a un soporte para el fraccionamiento del suero, y pronto se convirtió en la cromatografía de afinidad más ampliamente utilizada. El desarrollo de esta metodología se aceleró en la década de los 70, debido a los avances en la biología molecular, así como a la utilización del ácido nitrilotriacético (NTA) en los 80.

El NTA es una molécula que forma cuatro enlaces coordinados con el Ni^{2+} dejando dos valencias libres al metal para la interacción con las cadenas laterales de los residuos de histidina (anillos imidazol). En la figura 7 se presenta el modelo de la interacción entre las cadenas laterales de los residuos aminoácidos de la etiqueta His6X y el Ni^{2+} inmovilizado por el NTA⁶⁵.

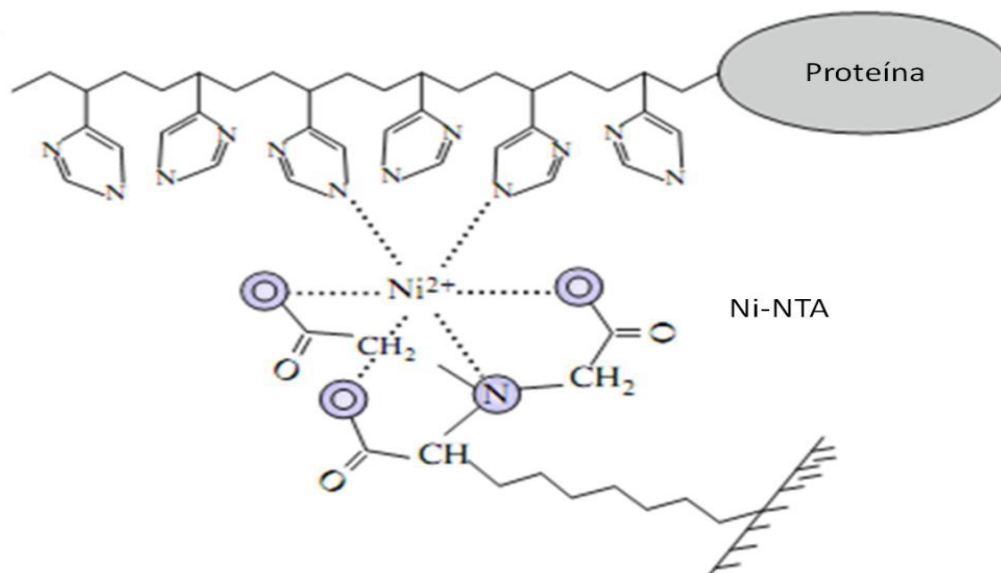


Figura 7. Modelo de la interacción entre la etiqueta de histidinas y el Ni^{2+} . Se forman cuatro enlaces coordinados entre el Ni-NTA, dejando dos valencias libres para la interacción Ni-His6X tomado de Luévano 2011⁶⁶.

Por lo tanto la aplicación más importante de IMAC es la purificación de proteínas recombinantes que se expresan fusionadas a un epítipo que contiene residuos consecutivos de histidina (la etiqueta 6X). Dada la rareza de encontrar segmentos de oligohistidinas expresados de manera natural en una proteína, 5 a 6 residuos garantizan alta selectividad. La etiqueta de hexahistidinas es el oligopéptido con la longitud adecuada para la mayoría de las aplicaciones y es la más ampliamente empleada^{67, 68}.

2. ANTECEDENTES

En las levaduras el sistema proteolítico juega un papel muy importante no solo regula la concentración de proteínas mediando el recambio de las mismas, sino que también funciona como control de expresión. Las LAPs son proteasas presentes en la mayor parte del ciclo celular, el conocer más acerca de ellas ayuda al entendimiento de vías metabólicas de células eucariotas, así como también a mejorar las estrategias para el uso de estos organismos como sistemas de expresión.

En el laboratorio Herrera-Camacho y colaboradores. En 2007, pusieron en evidencia una nueva exopeptidasa citosólica en *S. pombe*, la que fue nombrada “Leucín-aminopeptidasa yspII” (LAPyspII), la enzima es una metaloproteasa básica dependiente de Mn^{2+} pertenece a la familia de las peptidasas M17, es una proteína hexamérica con un peso molecular de 320 KDa, formada por 6 subunidades de 54 KDa. A partir de las estructuras cristalinas de la LAP de bovino y de *E. coli* se construyó un modelo in silico de la estructura de la LAP yspII en donde el dominio C-terminal constituido por 194-508 aminoácidos presenta un motivo α/β en forma de silla de montar y en este dominio se encuentra el sitio activo de la enzima ⁶⁹(figura 8A).

Dado la similitud del dominio C-terminal con la LAP de bovino, se pudieron determinar los residuos de aminoácidos involucrados en la coordinación con los iones metálicos cocatalíticos (Lys280, Asp285, Asp303, Asp362 y Glu364) y los aminoácidos que forman la cavidad hidrofóbica (Met300, Asn360, Ala363, Thr390, Leu391, Ala483 y Met486) (figura 8B), con respecto al metal se realizó un modelado por homología con la LAP-Zn de bovino, teniendo cinco residuos (Lys280, Asp285, Asp303, Asp362 y Glu364) Coordinando los dos iones de Zn^{2+} y Zn1, ubicados en el sitio estructural esencial para la actividad biológica de la enzima y unidos por los carboxilatos de Asp273 y Glu334(figura 8C) El Zn^{2+} , que se encuentra en el sitio de activación o regulación, puede intercambiar con otros cationes divalentes como Mg^{2+} , Mn^{2+} o Co^{2+} , este modelo in silico tendrá que ser reestructurado en el momento que se conozca cual es el ion metálico de la LAPyspII (Zn^{2+} y/o Mn^{2+}) ⁶⁹.

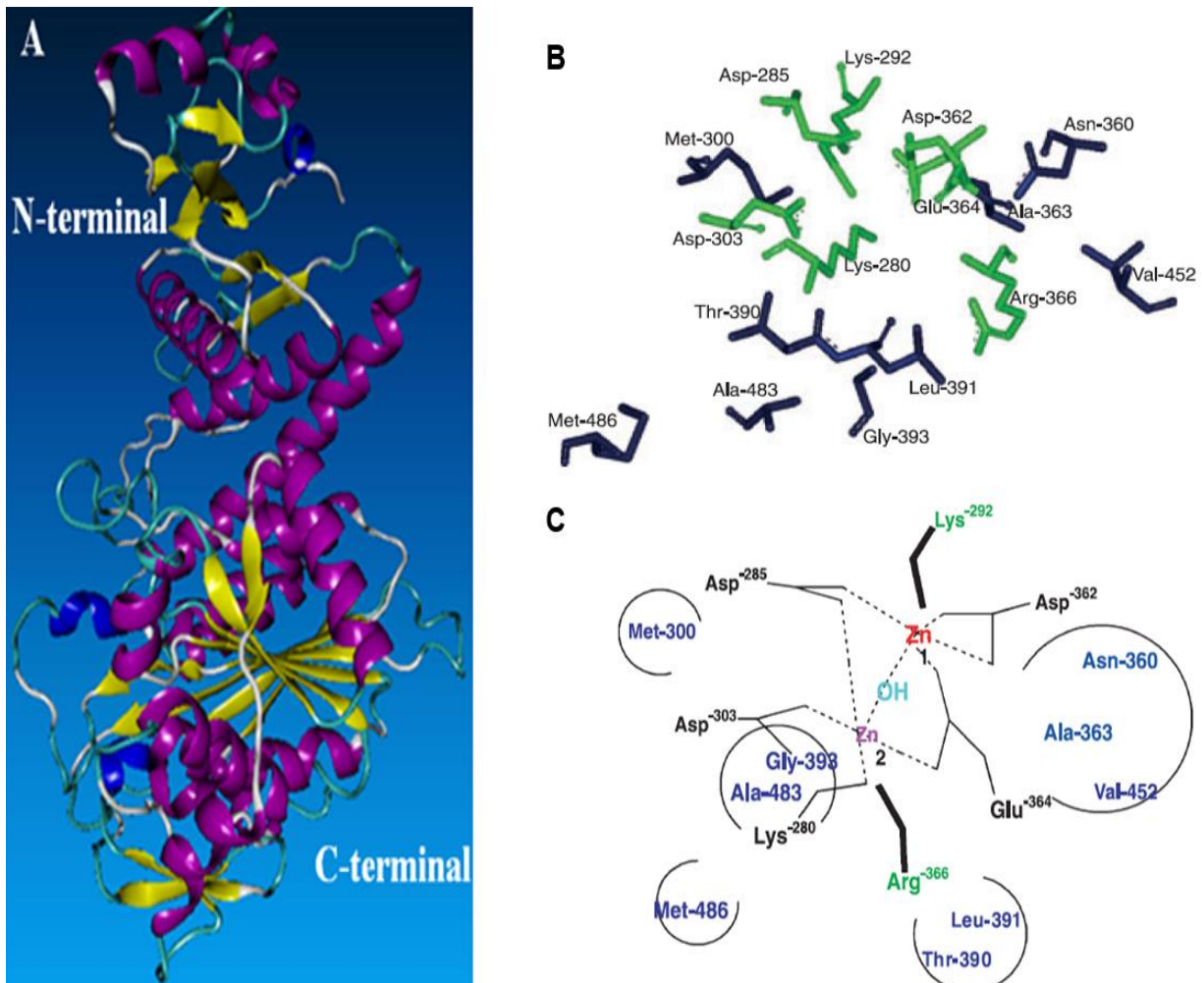


Figura 8. Modelo in-silico de la LAPyspII. Modelo por homología con las LAPs de bovino y *E. coli*. (Tomado de Herrera y col., 2007 Y de Rivera., 2009)^{69, 70}.

- A. Dominios N- terminal y C- terminal.
- B. Sitio activo: residuos catalíticos (verde), y residuos de la cavidad hidrofóbica (azul).
- C. Posibles sitios de interacciones con Zn²⁺ (o Mn²⁺).

Trabajos previos en nuestro laboratorio (tesis de maestría de Rivera 2009⁷⁰), mostraron que al desmetalizar a la enzima, la actividad se recuperaba en un 84.7 % al adicionar 1mM de Mn²⁺, mientras que con Zn²⁺ no había recuperación, hecho interesante pues se sabe que la mayoría de aminopeptidasas son dependientes de Zn²⁺, mientras que la LAPyspII parece ser una aminopeptidasa dependiente de Mn²⁺.

3. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad, *S. pombe* se usa ampliamente tanto en biotecnología como en la industria; por lo tanto, es de gran interés determinar las características de los procesos proteolíticos, debido a que juegan un papel fundamental en la regulación del equilibrio y recambio proteico y así como la levadura tiene importancia tanto en la investigación como en la industria, las “leucina aminopeptidasas” también, presentan esta importancia, inclusive aumentan significativamente el costo de producción biológica, por ello, para continuar con los estudios de la estructura molecular y el mecanismo de la actividad enzimática de la LAPyspII, se requiere determinar los iones que forman parte de su estructura y cuantificarlos, para ello se requiere a la enzima pura y en cantidades importantes, debido a que la enzima LAPyspII en *S. pombe* se produce en muy bajas cantidades, se decidió sobreexpresarla y purificarla.

Si bien, recientemente en el laboratorio se construyó una cepa de *P. pastoris* que sobreexpresa la LAPyspII recombinante, con la ventaja que la proteína es expulsada al medio libre de células, la enzima sólo se purificó parcialmente por cromatografía de filtración molecular⁷¹. Por lo que en este trabajo se pretende, producir la LAPyspII recombinante en *P. pastoris*, en grandes cantidades, y establecer las condiciones óptimas de purificación en un solo paso mediante cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (IMAC), y cuantificar el o los metales de la enzima, así como también determinar los parámetros cinéticos y compararlos con los de la enzima nativa.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

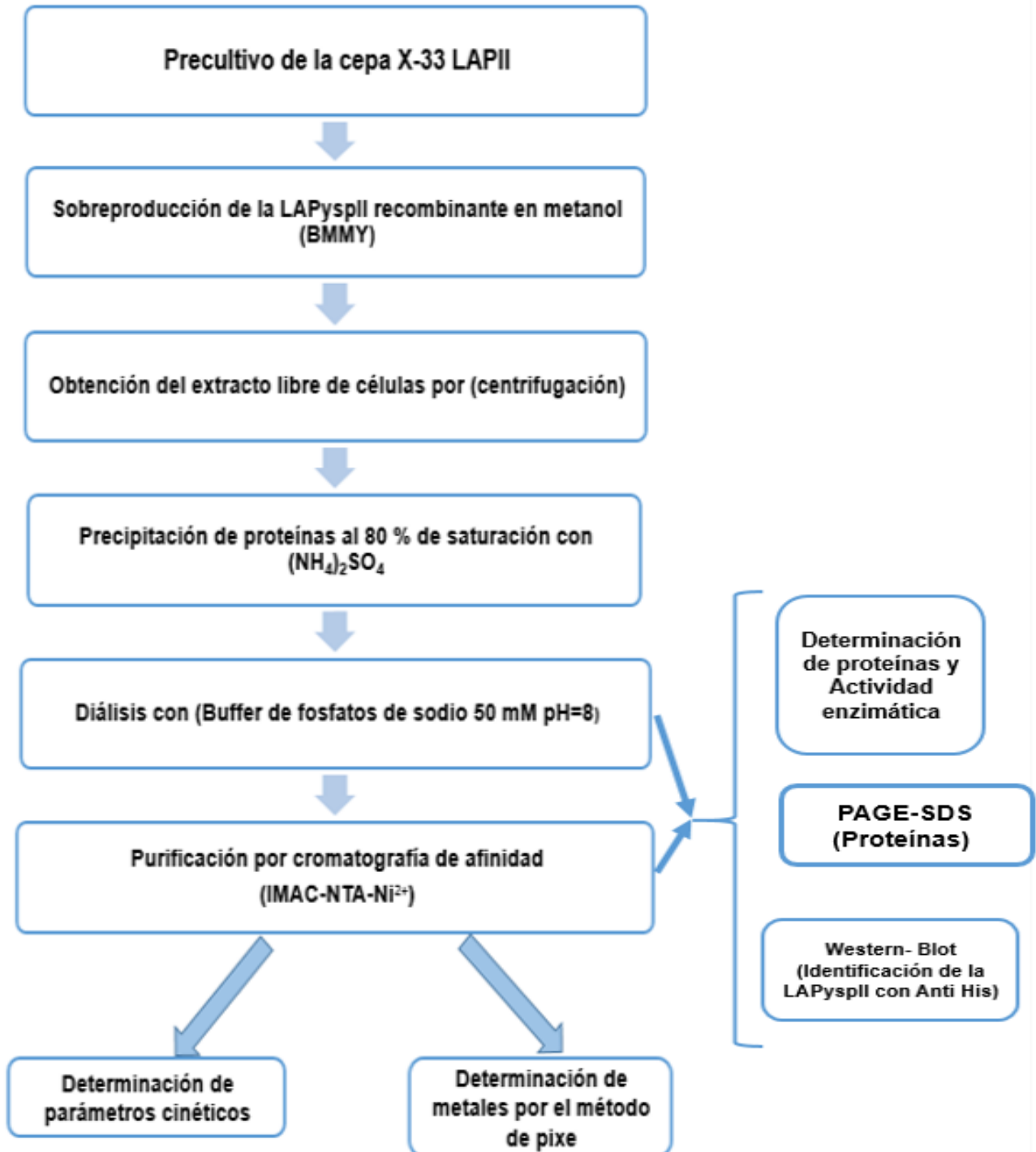
Producir la LAPyspII recombinante en la levadura *Pichia Pastoris* purificarla, determinar los parámetros cinéticos y la composición de metales.

4.1.1. Objetivos particulares

- Producir la LAPyspII recombinante en la levadura *P. pastoris* en la cepa PpX33-LAPII.
- Purificar a homogeneidad la LAP yspII recombinante por cromatografía de afinidad por metales (IMAC).
- Determinar los parámetros cinéticos de la LAPyspII recombinante y compararlos con la enzima nativa.
- Determinar la composición de metales de la LAPyspII por el método de PIXE.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Diagrama de trabajo



5.2. Sobreproducción de LAPyspII recombinante

Para el crecimiento e inducción de la cepa de *P. pastoris* productora de LAPyspII se usan los medios BMGY/BMMY, el primer medio contiene como fuente de carbono al glicerol (BMGY: Glicerol 1 %, YNB 1.34 %, Biotina 4×10^{-5} %, tampón 100 mM de fosfatos de potasio pH=6, peptona 2 % y extracto de levadura 1%) y el segundo medio contiene metanol como fuente de carbono (BMMY: Metanol 0.5 %, YNB 1.34%, Biotina 4×10^{-5} %, tampón 100 mM de fosfatos de potasio pH=6, peptona 2 % y extracto de levadura 1 %). Estos medios al contener extracto de levadura y caseína permiten que se establezca la secreción de proteínas y previene o decrecen la proteólisis de los productos excretados. Además estos mismos componentes permiten mejorar el crecimiento y la acumulación de la biomasa. Por otro lado el tampón en el medio estabiliza el pH, que ayuda a mantener el producto, cuando este se excreta al medio extracelular⁷¹.

Se realiza un precultivo de la cepa *P. pX33-LAPII* en 6 mL de medio YPD (peptona 2 %, extracto de levadura 1 %, dextrosa 1 %) con 6 μ l de Zeocina (100 mg/mL), se incuba por 24 h a 28 °C con agitación de 184 rpm. Posteriormente se lleva a cabo la sobreproducción de la proteína LAPyspII, se parte de un cultivo de 650mL en medio BMGY a una DO_{600nm} igual a 0.1, se incuba (28°C con agitación de 184 rpm) por 24 h o hasta alcanzar una $DO_{600nm}=8$. El cultivo se centrifuga a 5000 rpm por 10 min, las células se resuspenden en 650 mL de medio BMMY, adicionando metanol al 1% (V/V) cada 24 h, se toman muestras de 150 mL a los 2, 4, 6 y 8 días, hasta estandarizar la sobreproducción al 4° día, finalmente se centrifuga el cultivo a 5000 rpm por 10 min. En el sobrenadante (medio libre de células) se encuentra la proteína recombinante LAPyspII.

5.3. Precipitación por salado con sulfato de amonio $(NH_4)_2SO_4$

La capacidad de las sales neutras para influir sobre la solubilidad de las proteínas está en función de su fuerza iónica, donde la sal puede remover las moléculas de agua que hidratan la proteína, reduciendo su solubilidad, a una fuerza iónica lo suficientemente elevada, una proteína puede ser precipitada a esto se le conoce como (insolubilización por salado). Las proteínas precipitadas

por salado retienen su conformación nativa y pueden disolverse de nuevo, sin experimentar desnaturalización⁷².

Para llevar a cabo la precipitación por salado, se colocan 650 mL de sobrenadante libre de células (extracto enzimático soluble) en un matraz Erlenmeyer, se adiciona el sulfato de amonio en pequeñas cantidades correspondientes al 80% de saturación, se disuelve el sulfato de amonio en agitación suave y en frío 4 °C, dejando reposar 30 min a 4 °C, agitando de 15-20 segundos cada 10 min. Se centrifuga a 10000 rpm por 20 min. Se retira el sobrenadante, el precipitado se resuspende en 6 mL de tampón 50 mM de fosfatos de sodio a pH=8, se dializa en una membrana de celulosa (Sigma) durante 18 h a 4 °C en agitación constante con una solución amortiguadora de tampón 50 mM de fosfatos de sodio a pH=8, utilizando un volumen 100 veces mayor que el obtenido de la resuspensión del precipitado; se mide la concentración de proteínas totales y la actividad enzimática; para la precipitación después de la purificación, se realiza lo mencionado anteriormente, pero el volumen total de la elución se resuspende en 100 µL de Tris/HCL 5mM pH=8; se dializa en una membrana de celulosa (Sigma) contra el mismo tampón Tris/HCL 5mM pH=8, usando un volumen 40 veces mayor, se agita suavemente por 18 h a 4 °C. Se determina nuevamente la concentración de proteínas y la actividad enzimática de la enzima purificada.

5.4. Cromatografía de afinidad IMAC (NTA-Ni)

El sistema se basa en una cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (IMAC), la cual permite el proceso de purificación en un solo paso, el motivo por el cual se empleó este método se debe a que las histidinas son aminoácidos que exhiben una fuerte interacción con iones metálicos como el Ni²⁺, el anillo del imidazol de la histidina funciona como grupo donante de electrones formando fácilmente enlaces de coordinación con el metal de transición inmovilizado. La aplicación más importante de IMAC es la purificación de proteínas recombinantes que se expresan fusionadas a un epítipo que contiene residuos consecutivos de histidina (la etiqueta). Dada la rareza de encontrar segmentos de oligohistidinas expresados de manera natural en una proteína, 5 a 6 residuos garantizan alta selectividad ^{73,74}.

Puesto que la LAPyspII posee el motivo de histidinas, se usó el sistema IMAC-NTA-Ni para la purificar la enzima. Antes del proceso de purificación se preparan las todas las soluciones, y éstas así como la enzima LAPyspII se pasan por un filtro Φ de 0.45 μm . con la finalidad de que la columna no se tape. También se prepara la columna con la resina que contiene una matriz de agarosa Ni NTA (Amersham), siguiendo las instrucciones del proveedor como se describe a continuación.

Empaquetamiento de la resina en la columna:

1. Resuspender la resina Ni-NTA en su envase.
2. Adicionar 3 mL de la resina resuspendida en una columna de purificación de 10 mL (1.2 cm diámetro x 8 cm altura), dejar sedimentar y eliminar el alcohol, repetir este paso para obtener 1.5 cm de altura de resina dentro de la columna.
3. Lavar con 6 mL de agua estéril y proceder a sanitizar la resina.

Sanitización de la resina:

Lavar con 7.9 mL de agua estéril, 1.32 mL de EDTA 0.5 M, 5.3 mL de NaCl 0.5 M, 7.95 mL de agua estéril, 5.3 mL de NaOH 0.5 M y 7.9 mL de agua estéril.

Activación de la resina:

Para activar la resina se agregan 1.32 mL de NiCl_2 2 M, 13.2 mL de agua destilada, 5.3 mL de NaCl 0.5 M

Equilibración de la resina:

Agregar 13 mL de buffer 50 mM de fosfatos de sodio a pH= 8, 0.5 M de NaCl, 10 mM de imidazol, incubar con este buffer por 30 min, pasado este tiempo se procede a desechar el buffer de equilibrio y agregar la muestra previamente filtrada.

Incubación de la muestra:

La muestra se pone en contacto con la resina Ni-NTA, se incuba con una ligera agitación a 4 °C, por 180 minutos. Pasado el tiempo establecido, se procede a recolectar todas las fracciones con un flujo de recolección de 0.5 mL/min. Se nombra “fracción de no

pegado”, es la etapa donde salen las proteínas que no interaccionaron con la resina Ni-NTA.

Lavado:

La columna se lava con 12 mL de buffer 50 mM fosfatos de sodio a pH=8, adicionado con NaCl 50 mM e imidazol 20 mM; Se agrega muy lentamente el tampón para evitar despegar la proteína de interés y conseguir que salgan las proteínas contaminantes que aún se encuentren unidas a la resina de forma débil (etapa de lavado), se recolecta a un flujo constante de 0.5 mL/min.

Elución:

Se usan dos buffers, el primero constituido de 10.6 mL de buffer 50 mM de fosfatos de sodio a pH=8, NaCl 0.5 M e imidazol 600 mM y el segundo compuesto por 10 mL de buffer 100 mM de acetatos a pH=6, NaCl 1 M e imidazol 600mM 1M de NaCl, se recolecta a un flujo constante de 0.5 mL/min. En esta etapa se espera encontrar a la proteína de interés, la cual se verifica mediante un PAGE-SDS, Western-blot y actividad enzimática.

Para guardar la columna, se vuelve a sanitizar, agregando 12 mL de agua destilada y al final se guarda con 8 mL de Etanol 20 % a 4 °C, (para las purificaciones se parte de un cultivo de 650 mL, se concentra 100 veces y posteriormente se realizaran 3 purificaciones con 2 mL de muestra para purificación).

5.5. Determinación de proteínas totales

La determinación de proteínas se realiza por el método de Sedmak y Grossberg. La técnica se basa en la reacción que se produce cuando el azul de Coomassie G-250 entra en contacto con los grupos amino de las proteínas en medio ácido, produciendo un color azul marino, la intensidad de la coloración está relacionada directamente con la concentración de proteínas en una solución, la sensibilidad del método es de 1-10 µg de proteína. El azul de Coomassie G-250 al 0.06% se prepara en una solución de ácido perclórico al 3%⁷⁵.

La determinación de las proteínas de la muestra se realiza junto con una curva de calibración usando como estándar a la albúmina sérica bovina (BSA) a concentraciones de 1 a 15 μg (partiendo de una solución de 0.1 mg/mL). Se hace una mezcla de reacción, colocando de 10 a 20 μL de la muestra y la cantidad de BSA correspondiente por duplicado, y se completa con agua desionizada a 500 μL , se agregan 500 μL de la solución de azul de Coomassie y se deja incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente, las muestras se leen a una absorbancia de 620 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV-160. Se construye la curva de calibración graficando los valores de absorbancia en el eje Y y la concentración del estándar de albúmina en el eje X, y se determina la concentración de proteínas de la muestra interpolando los valores de absorbancia en la curva de calibración, considerando el factor de dilución se obtiene la concentración de la muestra en $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

5.6. Determinación de la actividad enzimática

La actividad enzimática de la LAPyspII recombinante se realiza mediante la metodología de Frey y Röhm, modificada por Herrera-Camacho et al⁶⁹. Se utiliza como sustrato sintético la L-Leucina p-Nitroalanina (leu-pNA). La mezcla de reacción se pone en un volumen final de 500 μL , con los componentes mostrados en la tabla 4.

Tabla 4. Componentes de la reacción para determinar la actividad enzimática.

COMPONENTE	μL	CONCENTRACIÓN FINAL
Agua tridestilada	225	
Tris-Base/HCl 200 mM pH=8	125	50 mM
MnCl ₂ 10 mM	50	1 mM
Muestra	50	
Leu p-NA 10mM	50	1 mM
*Volumen final	500	
* Los volúmenes de muestra pueden cambiar ajustando los volúmenes del agua para tener un volumen de reacción de 500 μL .		

Se incuba todo sin el sustrato por 10 min a 37 °C, pasado el tiempo se agrega la Leu p-NA, se vuelve a incubar hasta la aparición de una coloración amarillenta. La reacción se detiene agregando 500 µL una solución fría de EDTA 40 mM (pH=8) y cloroquina 20 mM, se agita vigorosamente y se mide a una absorbancia de 405 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV-160. Se usa esta absorbancia debido a que en la reacción se libera la p-nitroanilida (pNA) que absorbe a esa longitud de onda.

La actividad enzimática se expresa en miliunidades (mU); una mU se define como la cantidad de enzima que cataliza la liberación de un nanomol (nmol) de p-nitroanilida en un minuto bajo las condiciones antes mencionadas.

Para calcular la actividad enzimática en mU se utiliza la siguiente fórmula:

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

Donde:

Abs= absorbancia de la muestra a 405 nm

t=tiempo de reacción en minutos

ϵ =coeficiente de extinción molar de la p-NA (9900 M⁻¹ cm⁻¹)

l=paso de la luz de la celda 1 cm

0.001= Volumen final al que se mide la absorbancia en litros

10⁹=factor de conversión de moles a nanomoles

La actividad específica, por su parte se define como las miliunidades enzimáticas en relación con la cantidad de proteína en miligramos (mg) de la muestra.

La fórmula para determinar la actividad específica es:

$$Actividad\ específica[(nmol/min)]/mg = \frac{mU}{mg\ de\ prote\i na}$$

5.7. Concentración de las muestras para PAGE-SDS.

5.7.1. Precipitación de proteínas con acetona

Esta técnica se basa en la disminución de la solubilidad mediante la adición de un solvente orgánico ligeramente polar (etanol o acetona), produciendo agregados de moléculas proteicas que tienden a precipitar, esto se debe a que el solvente presenta una constante dieléctrica menor que la del agua, lo cual produce un incremento en las fuerzas de atracción entre cargas opuestas y una disminución en el grado de ionización de los radicales de las proteínas, y en consecuencia una disminución en la solubilidad de ésta⁷⁶.

En un tubo eppendorf se toman 150 μL de muestra enzimática y se añaden 9 volúmenes de acetona (1350 μL), se deja reposar a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 2 horas, agitando por inversión cada 30 min. Posteriormente las muestras se centrifugan a 10000 rpm por 15 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se retira la acetona y el precipitado se deja secar a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 20 minutos, se suspende en 10 μL de buffer reductor 1X para PAGE-SDS, se incuba por 5 minutos en agua hirviendo y se carga en el gel de poliacrilamida.

5.7.2. Liofilización

La liofilización es un proceso de deshidratación, que se produce a baja presión (vacío) y baja temperatura ($-40\text{ }^{\circ}\text{C}$). En la liofilización no ocurre la evaporación del agua a partir del estado líquido (normal en procesos de secados) sino la sublimación del hielo. Por este motivo los productos deben permanecer obligatoriamente solidificados (congelados) durante el secado. Al deshidratar completamente la muestra, se obtiene un polvo con todas las características del producto original: forma, color, textura, etc.⁷⁷.

Se ponen 100 μL de la muestra purificada en un tubo eppendorf, se congela a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 1 hora, posteriormente se enciende el liofilizador y hasta que baje la temperatura a $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$, se enciende la bomba de vacío, una vez que se estabilice la presión y la temperatura, se coloca la muestra congelada en el liofilizador y se deja 4 horas, obteniéndose un polvo ligero en el fondo del tubo.

Las muestras se resuspenden en 10 μL de buffer reductor 1X para PAGE-SDS, se obtiene obteniéndose un volumen final de 15 μL , se incuban por 5 min en agua hirviendo y se cargan en el gel de poliacrilamida.

5.8. Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (PAGE-SDS)

La electroforesis es una técnica altamente usada en Bioquímica y Biología Molecular, que permite separar moléculas cargadas de acuerdo a su peso molecular, bajo la influencia de un campo eléctrico⁷⁸, es un método conveniente, rápido y económico pues se requieren cantidades de muestra del orden de microgramos de proteína⁷⁹.

El gel se prepara en dos etapas, primero un gel separador al 12 % de acrilamida y después el gel concentrador al 4 % de acrilamida. Se adiciona SDS (docecilsulfato de sodio) como agente desnaturizante y como agentes polimerizantes: TEMED (N, N, N', N'-tetrametilendiamato) y persulfato de amonio (PSA). La preparación de los geles, así como el buffer de corrida tienen. La siguiente composición

Gel de corrida (12 %)

Reactivo	Concentración final	Volumen 5 mL
Tris-HCl 1 M, pH=8	0.564 M	1.022 mL
Acrilamida 29 %/bis 1 %	12 %	2 mL
SDS 10 %	0.1 %	50 μL
Persulfato de amonio (PSA) 10%	0.1 %	50 μL
TEMED (N, N, N'N'-tetrametilendiamato)	1/1000	5 μL
Agua destilada estéril	----	1.022 mL

Gel concentrador (4 %)

Reactivo	Concentración final	Volumen 3 mL
Tris-HCl 0.5 M, pH=6.8	0.0625 M	375 μ L
Acrilamida 29 %/bis 1 %	4 %	350 μ L
SDS 10 %	0.1 %	30 μ L
Persulfato de amonio (PSA) 10 %	0.1 %	30 μ L
TEMED (N, N, N'N'-tetrametilendiamato)	1/1000	3 μ L
Agua destilada estéril	----	2.21 mL

Buffer de corrimiento

Reactivos	Concentración/L
Tris- Base pH=8	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

Las muestras proteicas se resuspenden en una dilución 1:4 con el buffer reductor 4X (BR-4X: Tris-Base/HCl 0.25 M pH=6.8, SDS 8 %, 20 % beta-mercaptoetanol 0.01 %, glicerol 40 % y se adicionan unos granos de azul de bromofenol, hasta ver el color azul). Se incuban en baño de agua hirviendo por 5 minutos y se cargan en el gel. Las condiciones de corrimiento fueron: 1^a fase a 70 V por 1 h (gel concentrador), 2^a fase a 100 V por 3 h (gel separador). Posteriormente el gel se pone en agitación suave en una solución de tñido (metanol 50 %, ácido acético 10 %, azul de Coomassie 0.05 %) por una hora y luego de 30 a 60 minutos en una solución de desteñido (metanol 50 % metanol, ácido acético 10%) hasta observar las bandas de las proteínas.

5.9. Western Blot (Immunoblotting)

El Western blot es una técnica utilizada para identificar proteínas con anticuerpos específicos (primario) que sólo se unen a la proteína de interés, y por lo tanto sólo una banda debe ser visible. El primer anticuerpo se identifica con un segundo anticuerpo el cual está acoplado a una enzima para detectar de forma indirecta la unión del antígeno (proteína de interés) con el anticuerpo específico, las enzimas más utilizadas son fosfatasas y/o peroxidases acopladas a sustratos fluorescentes ^{80, 81}.

Una vez separadas las proteínas por SDS-PAGE, se hizo una transferencia semiseca a una membrana PVDF en un Mini Trans Blot-Cell BIO RAD. Se prepara el buffer de transferencia (BT) filtrado y frío a 4 °C, el cual contiene lo siguiente: Tris-base 0.024 M, glicina 0.19 M, SDS 10 %, metanol 20 %. Se hizo una transferencia semiseca en un Trans blot SD Cell, BIO RAD, utilizando un buffer de transferencia (BT) filtrado y frío a 4 °C (BT: Tris-base 2.5 M, glicina 0.19 M, SDS 10 %, metanol 20 %). Se colocan tres papeles filtros (previamente humedecidos en BT) en el equipo de transferencia, encima se pone la membrana (previamente activada con metanol 1 minuto e incubada 10 minutos en BT), encima de la membrana se pone el gel (previamente incubado por 10 minutos en BT) y encima se ponen otras 3 hojas de papel filtro. Las condiciones de la transferencia fueron 3 amperes, 24 V por 50 minutos. Se recupera la membrana y las siguientes etapas se realizan en un agitador a 4 °C, se lava con agua para eliminar el exceso de buffer de transferencia en agitación suave por 10 minutos. Para visualizar las proteínas transferidas en la membrana se coloca la membrana en una solución de rojo de Ponceau (0.5 g de rojo de Ponceau, 1 mL de metanol y se afora con 95 ml de agua) durante 30 segundos, pasado este tiempo se desecha el rojo de Ponceau, se procede a enjuagar con agua destilada tres veces o hasta que desaparezca el color rojizo intenso de la membrana y se observen las bandas rojas de proteínas transferidas. Posteriormente se lava la membrana con agua hasta que la membrana quede sin color para continuar con el revelado de la proteína de interés.

La membrana se incuba en agitación por 10 min en buffer de TBS-Tween (BTT: Tris-base 0.02 M (pH=8), NaCl 0.15 M, Tween-20 0.05 %, guardar a 4 °C) después se procede a bloquear la membrana en una solución al 5 % de leche descremada diluida en BTT por 1 hora, la membrana se lava 3 veces con BTT en intervalos de 10 minutos. Se incuba la membrana por 16 h con el

primer anticuerpo anti- histidina, acoplada a peroxidasa de rábano (HRP-Invitrogen) con una dilución 1:6000. La membrana se lava 3 veces con BTT en intervalos de 10 minutos y posteriormente se incuba 5 h con el segundo anticuerpo IgG de ratón acoplado a fosfatasa alcalina (AP-Invitrogen) con una dilución 1:4000.

El revelado se realiza en cuarto oscuro. Se prepara una mezcla de luminol y peróxido (1:1), se vierte sobre la membrana (la cual se encuentra entre dos hojas de acetato) y se deja reposar hasta obtener una fluorescencia, finalmente se coloca un filme radiográfico durante 5-30 segundos, después el filme se sumerge en una solución de revelado por 10 a 20 segundos, se lava en agua y se pasa a una solución de fijado por 20 segundos, se lava con agua y se deja secar.

5.10. Determinación de los parámetros cinéticos

La función principal de las enzimas es aumentar las velocidades de reacciones para tener los productos necesarios para el metabolismo. Para entender cómo funcionan las enzimas, necesitamos una descripción cinética de su actividad. La velocidad de catálisis aumenta linealmente a medida que aumenta la concentración del sustrato y luego empieza a estabilizarse y se aproxima a un máximo a concentraciones de sustrato más altas ⁸².

Para obtener los valores de la velocidad de reacción, los ensayos se llevaron a cabo a temperatura constante de 37 °C. La concentración del sustrato Leu-NA varía de 0.1 a 0.7 mM, a partir de una solución madre de 10 mM y los tiempos de reacción de 5 a 10 min. La cantidad de producto liberado por cada concentración de sustrato se grafica respecto al tiempo y de cada cinética se obtuvo la pendiente (nmol/min). Las pendientes (velocidades) se usaron para obtener la curva de saturación y estos datos se usan para obtener la representación de Lineweaver-Burk por medio del inverso de la velocidad y de la concentración de sustrato. Los datos de K_m y V_{max} se obtuvieron de este gráfico, y a partir de estos datos se obtuvo la constante de recambio (k_p) y la eficiencia cinética. Todos los ensayos se realizaron por duplicado y en 2 a 3 repeticiones independientes.

5.11. Determinación de metales por el método de PIXE

PIXE (Particle-induced X-ray emission), es una técnica de análisis elemental potente pero no destructiva. Actualmente utilizada rutinariamente por geólogos, arqueólogos, conservadores de arte y otros para ayudar a responder a cuestiones de procedencia, datación y autenticidad. La teoría cuántica afirma que los electrones en órbita de un átomo deben ocupar niveles discretos de energía para ser estables. El bombardeo con iones de suficiente energía (generalmente protones MeV) producidos por un acelerador iónico, causará la ionización interna de los átomos en un espécimen. Los electrones de la capa externa caen abajo para substituir vacíos de la capa interna, este cambio de electrones emiten rayos X característicos para cada elemento. Un detector de energía dispersiva se utiliza para registrar y medir estos rayos X, así como las intensidades⁸³.

Se toman 2 alícuotas de 10 μL y 5 μL de la muestra purificada y liofilizada, se corren en un gel de poliacrilamida al 12 %, se cortan las bandas donde está la LAPyspII recombinante, y se deshidrata dejando el gel en un tubo a temperatura ambiente por 12 h, posteriormente las muestras se entregan en el Instituto de Física de la UNAM con el DR. José Luis Ruvalcaba para su análisis.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Cepa productora de LAPyspII (PpX33-LAPII)

Se trabajó con la cepa de *Pichia pastoris* productora de LAPyspII (P. pX33-LAPII) construida precedentemente en el laboratorio (Cerriteño 2014), donde al gen de la alcohol oxidasa (AOX1-AOX1TT) del 4° cromosoma de la cepa X33, se le insertó el ORF del gen *ape2*⁺ por desplazamiento, obteniendo así un fenotipo Mut⁺, cuando se pone la cepa con metanol como fuente de carbono, se enciende el gen AOX1 para su crecimiento y al mismo tiempo expresa el ORF del gen *ape2*⁺, produciendo la enzima LAPyspII.

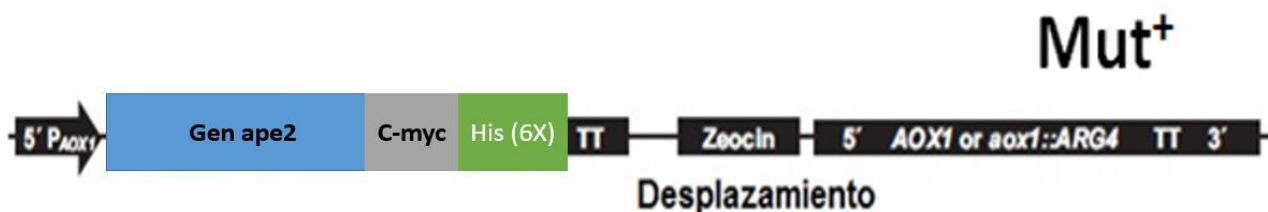


Figura 9. Inserción del ORF de LAPyspII en el genoma de *P. pastoris*
Tomado y modificado de Invitrogen⁷¹.

Por otro lado, al inicio del ORF del gen *ape2*⁺, tiene un factor α , y al final un epítipo C-myc y un motivo de seis histidinas (6X). El factor α codifica para una secuencia en el extremo amino terminal de la proteína que la señala para ser expulsada al medio extracelular, lo que facilita su purificación. Por otro lado, la LAPyspII tiene en el extremo C-terminal un epítipo C-myc y un motivo de 6 histidinas los cuales facilitan la identificación de la proteína por western blot y con el motivo de His (6X) se purifica la proteína de forma muy eficiente por cromatografía de afinidad por inmovilización de iones (IMAC).

6.2. Determinación de las condiciones óptimas de crecimiento de la cepa productora de LAPyspII (X33-LAPII) en metanol

La cepa productora de LAPyspII (P. pX33-LAPII) se crece primero en glicerol como fuente de carbono y para la expresión y producción de la enzima recombinante se cambia la fuente de carbono por metanol. En 2016, Zhongmei y cols. Propusieron condiciones óptimas de crecimiento para su proteína aminopeptidasa encontrada en *B. subtilis* en glicerol por 48 h y una inducción con metanol al 1 % por 12 días⁸⁴, así también en 2015, Vici y cols. Propusieron las siguientes condiciones 24 h en glicerol y una inducción con metanol al 1% por 6 días⁸⁵. En nuestro laboratorio, Flores en 2015 propuso las condiciones de crecimiento para la LAPyspII de 24 h en glicerol e inducción con metal al 0.5 % por 6 días⁸⁶.

Con estos antecedentes en este trabajo se probaron 3 condiciones: una incubando las células con glicerol por 24 h e induciendo con metanol al 0.5 %, la segunda condición fue incubando a las células en glicerol por 24 h e induciendo con metanol al 1 % y la tercera condición propuesta fue incubando a las células en glicerol por 48 h e induciendo con metanol al 1 %, para ver si era significativo el aumento de la población celular, por lo menos hasta 8 días.

La figura 10, nos muestra el crecimiento de la cepa productora de LAPyspII en metanol. Donde se observa que al inducir con de metanol al 1 % (líneas a y b) el crecimiento de la población es mayor en comparación a las células que se inducen con metanol al 0.5 % (línea c). Esto se justifica, debido a que el evento de inducción es crítico, ya que si la inducción se hace en un momento inapropiado (antes de agotarse la fuente primaria de carbono o mucho después), o si el suministro de metanol es excesivo o muy limitado, la respuesta puede ser muy lenta, lo que afecta el desarrollo del cultivo y la expresión de la proteína⁸⁷

Por otra parte no observamos diferencias significativas al inicio del crecimiento (día 0), donde los cultivos previamente crecieron 24 h (línea b) y 48 h (línea a) en glicerol (D.O. de 6 y 8), esto nos indica que posiblemente a las 24 h ya entraron a la fase estacionaria donde el crecimiento ya no es significativo. Se observa también que los dos cultivos con metanol al 1 % (línea a y b) crecen durante 8 días de forma muy similar, por lo que se decidió quedarse con las condiciones del cultivo de 24 h con glicerol y después cambiarle la fuente de carbono a metanol y por 8 días inducir con metanol al 1 %.

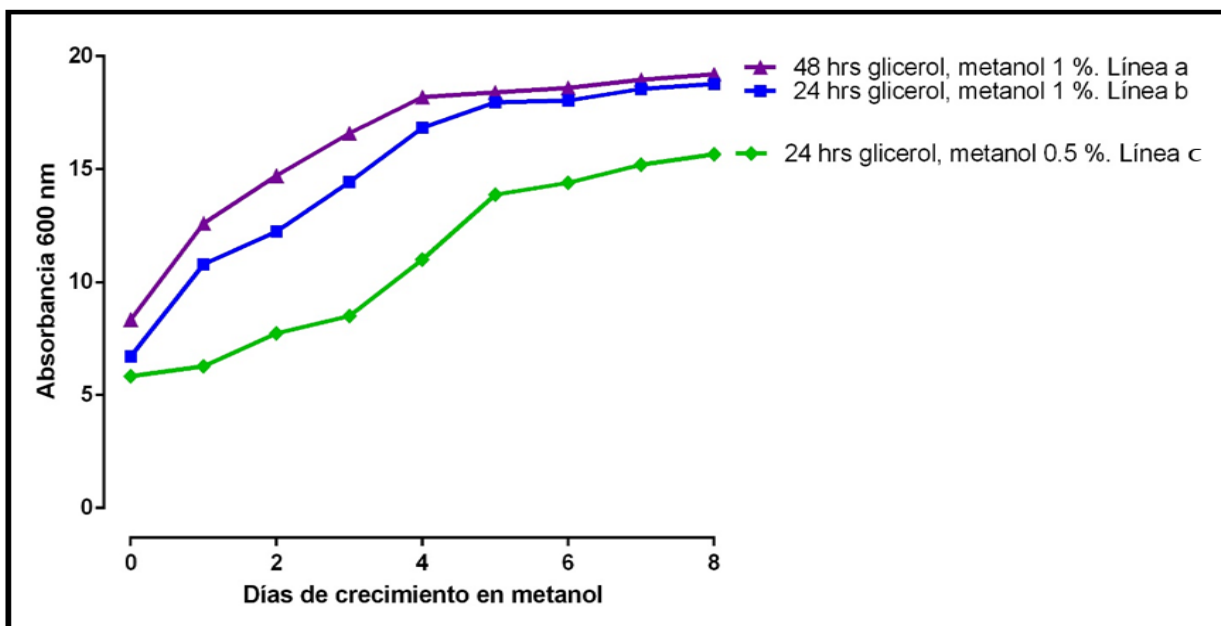


Figura 10. Curva de crecimiento celular de la cepa productora de LAPyspII con metanol como fuente de carbono. Se parte de cultivos celulares crecidos a 24 y 48 h con glicerol. Los ensayos fueron realizados por duplicado y con 2 experimentos diferentes. Los valores se analizaron con GraphPad Software.

6.3. Condiciones óptimas de producción de la LAPyspII con metanol como inductor

Para determinar la producción de la LAPyspII a lo largo del crecimiento de la cepa con metanol (figura 10 línea b), hicimos previamente dos consideraciones: LAPyspII recombinante cuenta con un factor α que permite expulsar a la proteína de interés al medio extracelular, después del cultivo se recupera la proteína por centrifugación en el medio libre de células. Como la proteína queda muy diluida y debido a que se manejaron volúmenes grandes de medio, para determinar la actividad enzimática, las proteínas se precipitaron con sulfato de amonio a 80 % de saturación y se concentraron 100 veces.

Por otro lado en trabajos precedentes, se determinó que al precipitar en el rango de 0-30% se obtiene la estructura hexamérica de la LAPyspII recombinante, y en el rango de 0-80% se obtiene la estructura molecular monomérica, la cual es activa enzimáticamente⁸⁸.

Para determinar las condiciones óptimas de producción de la LAPyspII con metanol como inductor se decidió trabajar la enzima en su forma monomérica. Precipitando el medio libre de células al 80% de saturación, concentrando la proteína 100 veces, para así medir la actividad

enzimática a diferentes días (2, 4, 6 y 8) para ver las variaciones que se presentaban a lo largo del crecimiento. En la figura 9 se muestra que durante la curva de crecimiento con metanol (línea azul) hay actividad enzimática, teniendo un pico máximo a los 4 días de inducción con metanol (línea morada) contando con una D.O de 16.8 y una actividad específica de 126.4 [(nmol/min)/mg], al 4° día nos indica que conforme pasan los días de expresión, se ve una marcada diferencia entre los días previos y los posteriores a este, lo cual es bueno debido a que esto sirvió como un marco de referencia, para saber cuántos días debe llevarse la inducción para tener la mayor cantidad no solo de proteínas sino también de actividad específica, esto debido a que la LAPyspII es una enzima y si bien es cierto que nos interesa la cantidad de proteína que se produzca con el crecimiento de esta cepa, no ayudaría mucho si esta no está activa enzimáticamente, como se muestra en la figura 11, donde se observó que hay un decremento de esta actividad en los días 6 y 8.

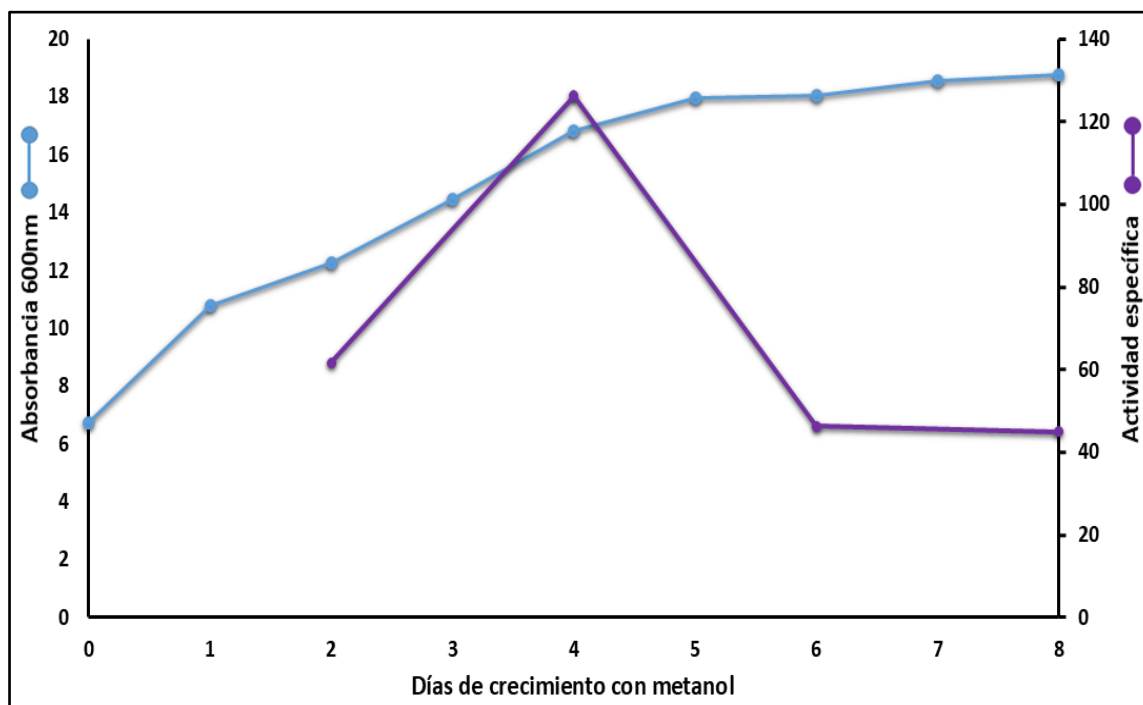


Figura 11. *Actividad enzimática de la LAPyspII a lo largo del crecimiento celular de la cepa productora con metanol como fuente de carbono. Crecimiento celular determinado a una absorbancia de 600 nm, Los ensayos fueron realizados por duplicado y con 2 experimentos diferentes.*

6.4. Presencia de la LAPyspII durante el crecimiento con metanol como inductor

Se procedió a realizar un PAGE-SDS de los días 2, 4, 6, 8 de sobreexpresión de la LAPyspII y comprobar que la actividad enzimática determinada corresponde a la presencia de la proteína recombinante LAPyspII. En la figura 12 se observa que en todos los días de inducción con metanol, está presente una banda de proteína mayoritaria a la altura de 60 kDa, correspondiente al peso molecular de la enzima LAPyspII, esta banda es ligeramente más intensa en el día 4°. En 2017 Wang y cols.⁸⁹, explican que la actividad enzimática de su proteína recombinante Proly1, varía conforme a las reservas de nutrientes presentes en su medio y que a pesar de poder tener una buena producción de proteína, la actividad enzimática se ve afectada, contemplando lo anterior vemos que tiene una amplia relación con el experimento que se realizó a las 24 h de estar en glicerol y luego ser inducido con metanol al 1%, donde se ve buena cantidad de proteínas en el PAGE- SDS, pero el pico máximo de actividad es al 4° día, determinado durante la curva de crecimiento y para confirmar que se trata de la LAPyspII recombinante, se realizó un western blot usando el motivo de histidina (6X) que tienen la proteína recombinante por medio del Anti-His. En la figura 10 (lado derecho) se observa la presencia de la LAPyspII solo en los días 4° y 6° del cultivo con metanol.

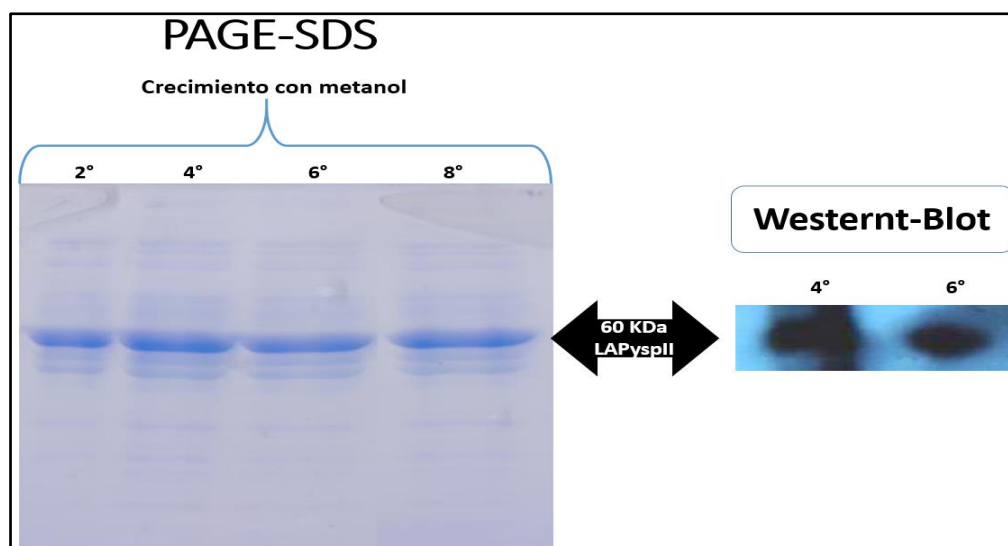


Figura 12. Presencia de la LAPyspII recombinante en los diferentes días de crecimiento con metanol. PAGE-SDS y Western Blot (anticuerpo Anti-histidina). Extractos libres de células precipitados y concentrados en los días 2, 4, 6, 8 de sobreexpresión, el experimento se realizó por duplicado.

Con los resultados de los experimentos de las figuras anteriores se decidió trabajar con cultivos después de 4 días de inducción con metanol.

6.5. Purificación de la LAPyspII recombinante por Cromatografía de Afinidad por inmovilización de iones (IMAC-Ni-NTA)

La proteína LAPyspII recombinante cuenta con una etiqueta de 6 histidinas, esto hace posible la utilización del método cromatográfico de afinidad por metales inmovilizados (IMAC) para su purificación, donde Posteriormente para eluir las proteínas se ponen concentraciones elevadas de imidazol, interaccionando éste con el Ni²⁺ y desplazando a la proteína⁹⁰.

Con base a la literatura Correa y cols. En 2017⁹¹ purificaron la enzima leucina aminopeptidasa de *M. tuberculosis* (MtLAP) utilizando como buffer de unión con imidazol 20 mM, Tris/HCl 20 mM a pH=7.9 y NaCl 0.5 M y como buffer de elución imidazol 400 mM; En 2016 Zhongmei y cols.⁸², purificaron la proteína aminopeptidasa de *Bacillus subtilis* con el buffer de unión compuesto de imidazol 10 mM, 50 mM de buffer de fosfatos pH= 7.4, NaCl 0.5 M el buffer de elución con imidazol 500 mM, también Vici y cols. En 2015⁸⁵ purificaron la proteína Lipasa A de *Beauveria bassiana* con buffer de unión compuesto de NaCl 500 mM, 10 mM buffer de fosfatos pH= 7.0 y un buffer de elución con imidazol 250 mM. En nuestro laboratorio Cerriteño en 2016⁹², purificó el ectodominio de la hemaglutinina neuraminidasa de *Rubulavirus porcino* con un buffer de unión compuesto de imidazol 10 mM, NaCl 0.4 M y buffer de fosfatos 50 mM a pH=8 y como el buffer de elución uso imidazol 400 mM.

Para la purificación de la LAPyspII recombinante se usaron diferentes condiciones cambiando las concentraciones de imidazol (10 y 20 mM), NaCl (0.3 M y 0.5 M) como buffer de unión y diferentes concentraciones de imidazol (300, 400, 500 y 600 mM) para la elución, esto con base a la literatura consultada anteriormente, así como también se varió el pH (7, 7.5 y 8). Las mejores condiciones que se lograron obtener para la purificación por IMAC fueron las siguientes: buffer de unión compuesto de imidazol 10 mM, NaCl 0.5 M, buffer de fosfatos 50 mM a pH=8 y buffer de elución, imidazol 600 mM, NaCl 0.5M, buffer de fosfatos 50 mM a pH=8 e imidazol 600mM, NaCl 1 M, buffer de acetatos 100 mM pH=6.

En la figura 13 se muestra el perfil de elución de la LAPyspII recombinante de la Cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (IMAC-Ni-NTA). Después de cargar la muestra en la columna se observa una absorbancia alta a 280 nm de proteínas correspondientes a la fracción del “No pegado”, que indica la presencia de proteínas en la muestra no interaccionan de ninguna manera con el níquel. Posteriormente al poner el buffer de lavado (fracciones “lavado”), se observa como la absorbancia va disminuyendo, eliminando las proteínas que podrían estar retenidas de forma muy débil y/o teniendo en consideración que en estos lavados se están eliminando algunas proteínas contaminantes que no salieron en la fracción del no pegado, la absorbancia no llega a 0.0 debido a que no se consideró la medición de tampón utilizado en cada una de las etapas. Finalmente cuando se pone el imidazol a altas concentraciones (600 mM), se observa en las fracciones de “elución” que la absorbancia aumenta mostrando un pico muy ancho el cual se prolonga en las fracciones de postelución, en esta última etapa de postelución fue necesario aumentar NaCl hasta 1M para tratar de despegar toda la enzima.

Las fracciones de las diferentes etapas se juntaron para determinar la concentración de proteínas y la actividad enzimática; Las fracciones de la elución y postelución se juntaron haciendo una sola fracción de elución-postelución, la cual se concentró 100 veces para llevar a cabo todas las mediciones. En la Figura 14 A nos muestra la cantidad de proteínas de cada una de las etapas de la purificación, donde se observa que hay una baja cantidad de proteínas tanto en el “no pegado” como en el “lavado”, mientras que en la fracción de “elución-postelución” tiene alrededor del 30 % de proteínas, del 100 % de proteínas de la muestra que se introdujo en la columna se recuperara el 64% de proteínas en las diferentes fracciones (barra morada), donde el otro casi 35 % se pierde, desde el momento de filtrar la proteína, hasta la proteína que no se puede despegar de la resina.

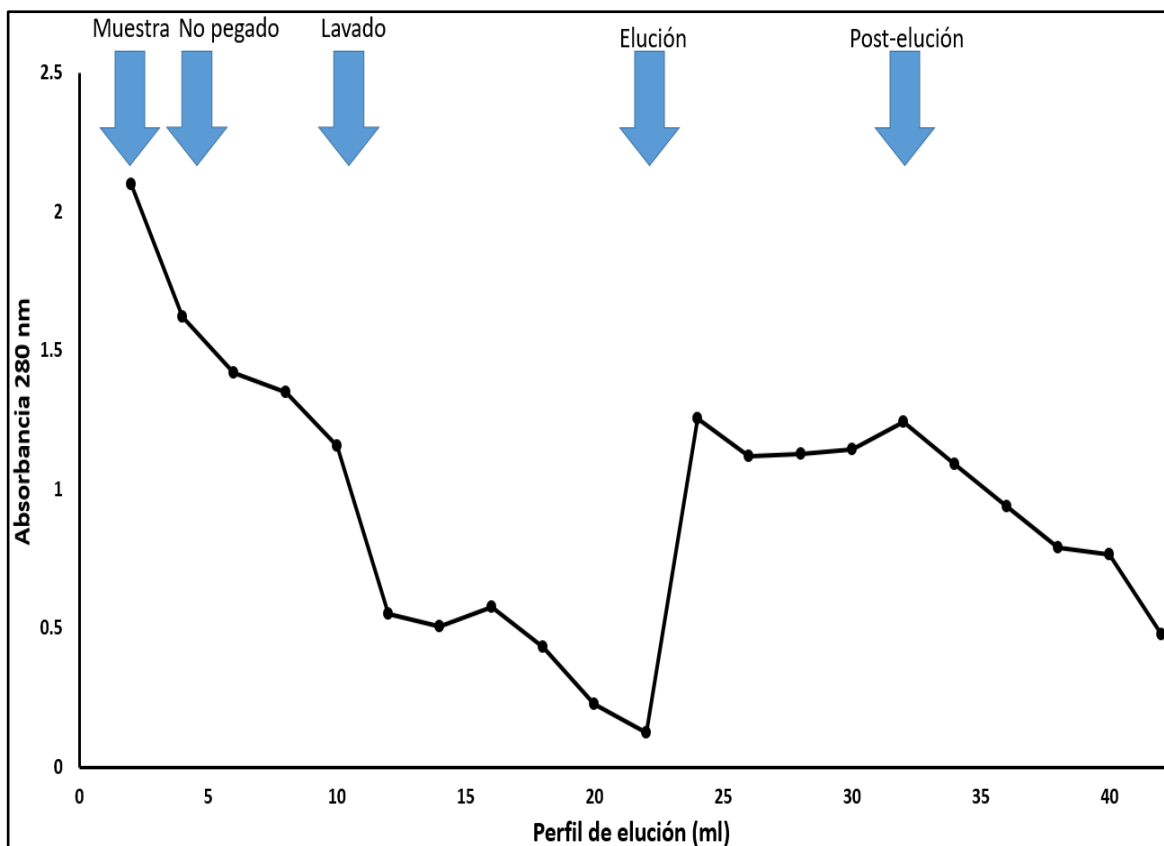


Figura 13. Perfil de elución de la LAPyspII recombinante por cromatografía de afinidad por metales inmovilizados Ni-NTA a partir del concentrado por precipitación (80% saturación de sales) del extracto libre de células.

Buffer de la muestra: fosfatos 50 mM, pH=8, imidazol 10 mM, NaCl 0.5 M.

Buffer de lavado: fosfatos 50 mM, pH=8, imidazol 20 mM, NaCl =0.5 M.

Buffer de elución: fosfatos 50 mM, pH=8, imidazol 600 mM, NaCl 0.5 M.

Buffer de acetatos 100 mM, pH=6, imidazol 600 mM, NaCl 1 M.

El experimento se realizó por duplicado.

Con respecto a la actividad enzimática, en la figura 14 B es importante observar que en la fracción elución-postelución está la mayor parte de la actividad enzimática en mU (80% con respecto al total).

Paralelamente para observar las proteínas y la LAPyspII recombinante en cada una de las etapas se realizó un corrimiento electroforético y un western blot. En la figura 15 se observa que la muestra que se mete a la columna tiene muchas proteínas, las cuales van cayendo en el “no pegado” y en el “lavado”, teniendo en las “fracciones de elución” una sola banda de proteína

de 60 KDa, en el carril de la “elución” es importante observar una sola banda más intensa alrededor de 60 KDa que es el peso molecular del monómero de la LAPyspII recombinante. La presencia de la LAPyspII recombinante se confirmó con el western blot donde se observa el reconocimiento específico del motivo de histidina (6X) de nuestra proteína recombinante por el anticuerpo Anti-His.

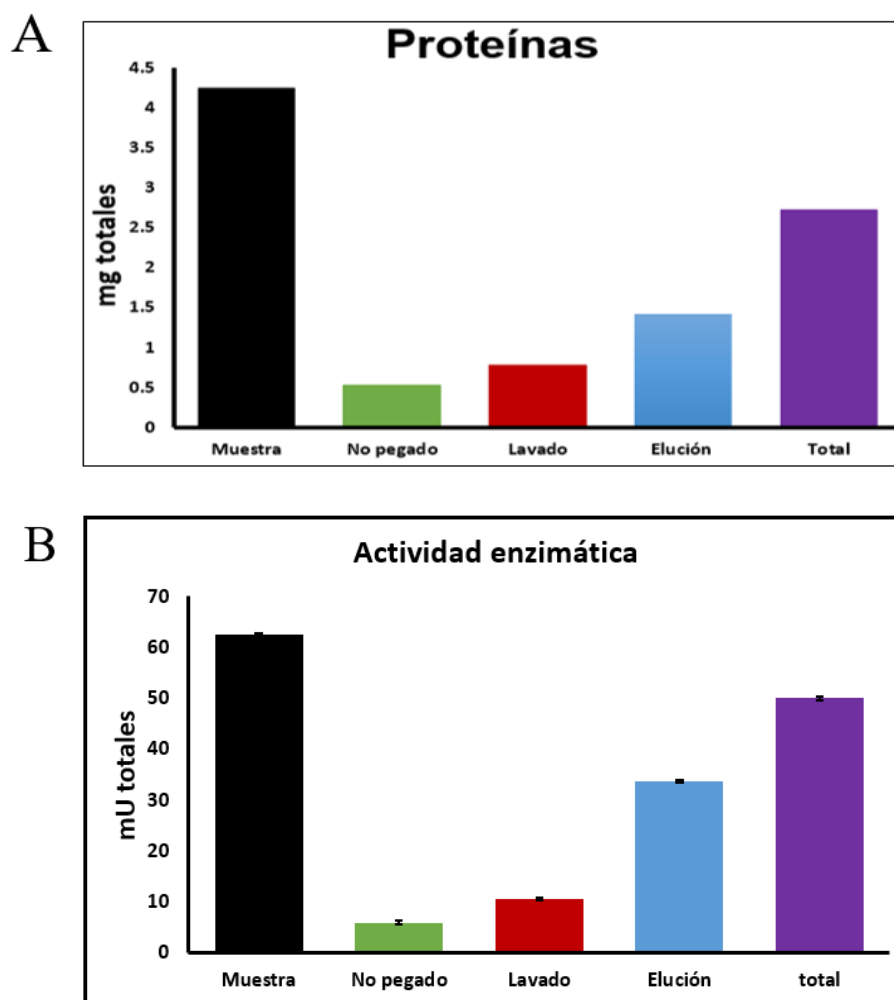


Figura 14. Concentración de Proteínas y actividad enzimática en las diferentes etapas del IMAC.

A) Concentración de proteínas totales expresada en mg.

B) Actividad enzimática total en mU.

Los experimentos fueron realizados por duplicado y analizados con GraphPad Software.

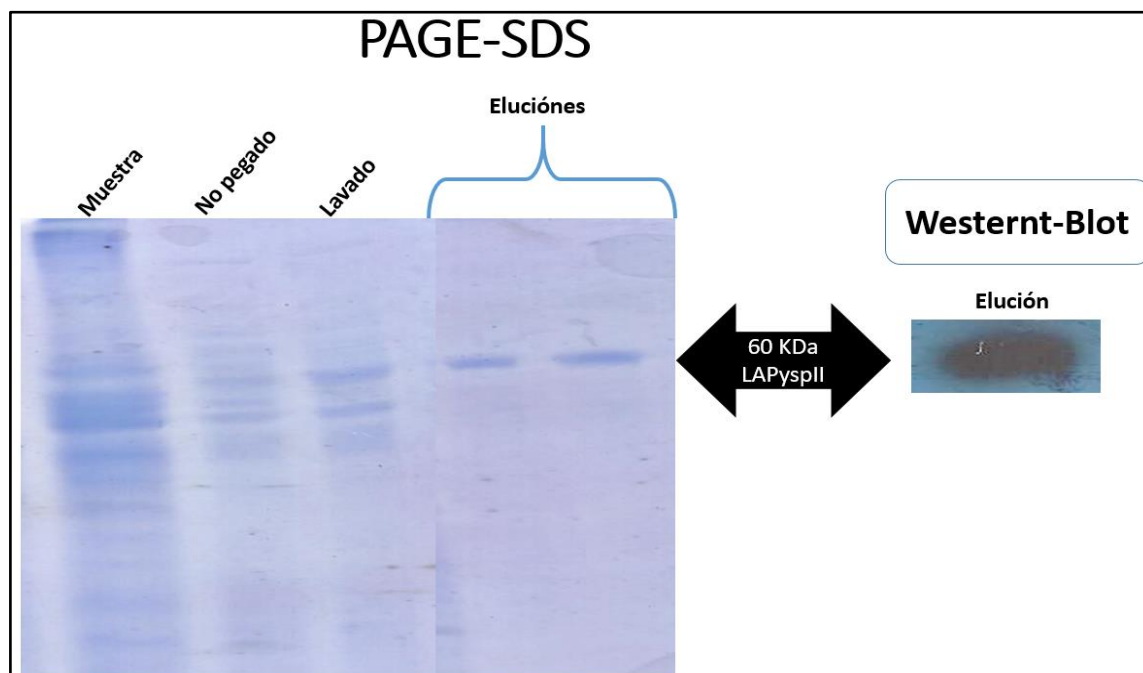


Figura 15. Presencia de la LAPyspII recombinante. Análisis de diferentes etapas de purificación (IMAC-Ni-NTA) por PAGE-SDS y Western Blot, el experimento se realizó por duplicado.

Por último, para obtener los rendimientos globales y grado de purificación, se tomó en cuenta en una primera etapa la muestra del medio libre de células concentrada y en una segunda etapa la elución y postelución juntas de la cromatografía de afinidad Ni-NTA. En la tabla 5 se muestran los resultados, teniendo un rendimiento del 35 % con un factor de purificación de alrededor del 4 %. Si bien este rendimiento es bueno el factor de purificación es bajo posiblemente debido a la naturaleza de la LAPyspII, se debe considerar que es una proteína hexamérica y que se aisló en su forma monomérica, la cual también tiene actividad, pero posiblemente como monómero se vuelve más lábil reflejándose en un factor de purificación bajo. Por otro lado también hay que tener en cuenta que se partió de proteínas que son excretadas al medio libre de células, donde al recolectar la proteína excretada, reducimos la cantidad de proteínas contaminantes. Lo importante en nuestro caso es que a pesar de tener un factor de purificación bajo, la proteína LAPyspII se purificó a homogeneidad (figura 15)

Tabla 5. *Etapas de Purificación de la LAPyspII recombinante y rendimiento.*

Proceso	ml obtenidos	Proteínas totales (mg)	Unidades enzimáticas Totales (nmol/min)	Actividad Especifica [(nmol/min)/mg]	% de rendimiento	Factor de purificación
Extracto libre de células Concentrada 100 veces	6 mL	5.55	387	70	100%	1
IMAC- Ni-NTA Concentrada 40 veces	1.7 mL	0.53	136	258	35.1%	3.68

6.6. Determinación de los parámetros cinéticos de la LAPyspII recombinante

La proteína LAPyspII corta enlaces peptídicos reconociendo aminoácidos hidrofóbicos como la leucina y la metionina en el extremo N-terminal. En 2007 cuando se describió la LAPyspII (Herrera et al.)⁶⁹ se determinaron los parámetros cinéticos K_m , V_{max} y k_p de la enzima nativa hexamérica con el sustrato sintético L-Leu-pNA.

En este trabajo se produjo la LAPyspII recombinante en su forma monomérica, por lo que con la enzima purificada se determinaron los parámetros cinéticos para poder comparar la eficiencia catalítica de nuestra proteína recombinante, con la proteína nativa.

Previamente se realizaron cinéticas a diferentes tiempos de 2, 5 y 10 minutos para establecer un tiempo óptimo que permitiera medir la velocidad inicial, estableciendo 5 minutos con los mejores resultados. En la figura 16, se muestran las cinéticas de reacción observando la liberación de la p-nitroanilida a los 5 minutos, donde las pendientes van en aumento en función de las diferentes concentraciones del sustrato L-Leu-pNA (0.1 a 0.7 mM).

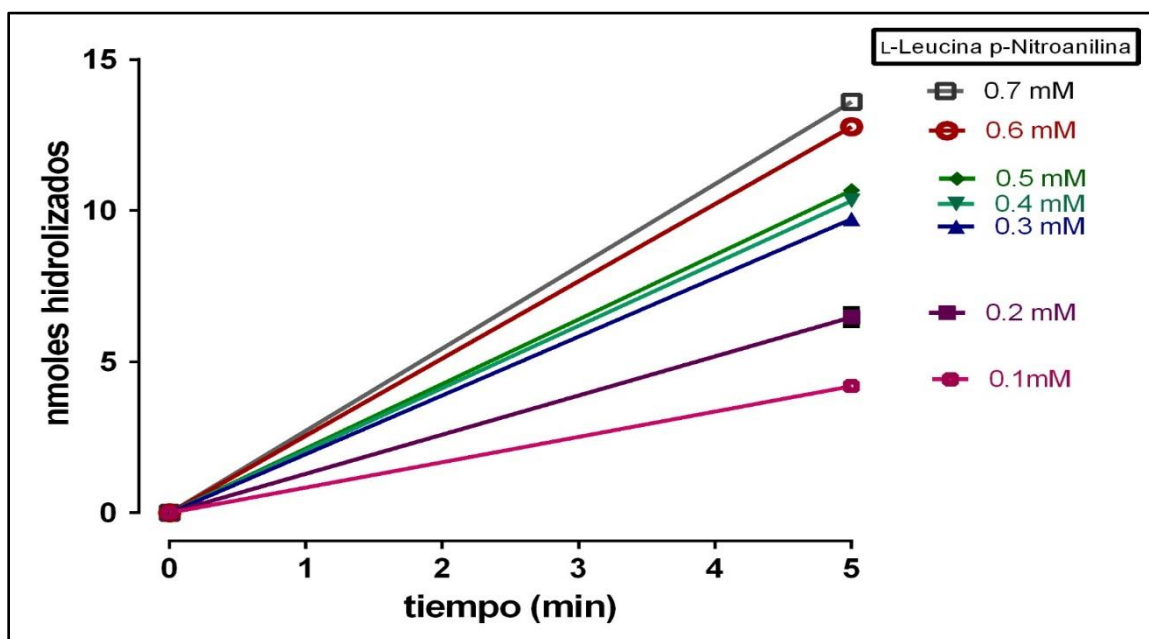


Figura 16. Cinéticas de reacción enzimática.

Liberación de nmoles de L-Leucina en función del tiempo de reacción a diferentes concentraciones del sustrato L-Leucina-p-NA variando el tiempo de reacción. Los ensayos fueron realizados por duplicado y con 2 experimentos diferentes. Los valores se analizaron con GraphPad Software.

Posteriormente se construyó la curva de saturación de la enzima por el sustrato tomando la velocidad inicial en función de la concentración del sustrato. La figura 17 nos muestra la curva de saturación de la LAPyspII recombinante por el sustrato (L-Leu-pNA) observando un comportamiento típico de cinética de Michaelis-Menten.

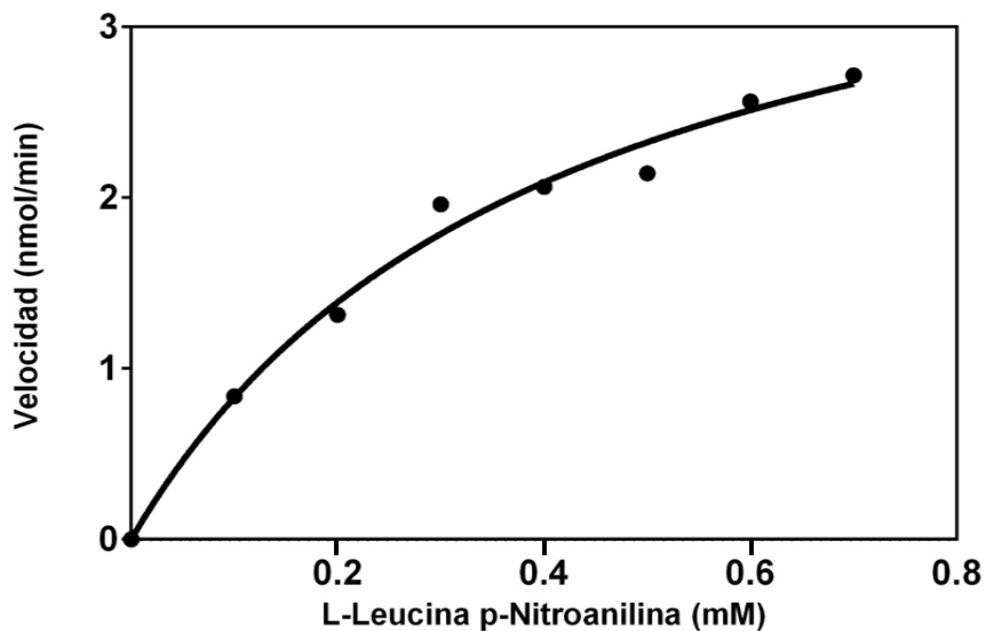


Figura 17. Curva de saturación de la proteína LAPyspII recombinante. Por el sustrato L-Leucina-p-NA, Los ensayos fueron realizados por duplicado y con 2 experimentos diferentes. Los valores se analizaron con GraphPad software.

Posteriormente los parámetros cinéticos fueron determinados con la representación de Lineweaver-Burk, graficando la curva de saturación en función del sustrato en doble recíproca como se muestra en la figura 18. Los puntos se ajustan a una línea recta, mostrando una buena correlación en la linearización de los puntos ($R^2 = 0.989$).

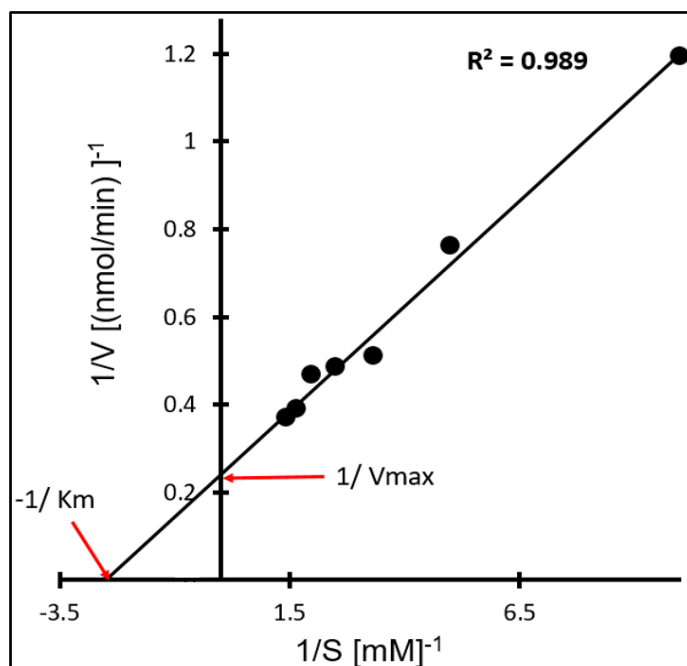


Figura 18. Representación de Lineweaver-Burk. Recíproco de los valores de la curva de saturación de la LAPyspII por la L-Leucina-p-NA. Los ensayos fueron realizados por duplicado y con 2 experimentos diferentes. Los valores se analizaron con GraphPad software.

Se obtuvieron los valores de K_m (recíproco del intercepto con el eje de las X y la V_{max} (recíproco del intercepto con el eje de las Y, así como también se determinó la k_p tomando en cuenta la cantidad de la enzima purificada empleada en cada una de las cinéticas ($k_p = V_{max}/enzima$), y con estos datos se determinó la eficiencia cinética. Los valores experimentales obtenidos así como los valores de la LAPyspII nativa reportados anteriormente se muestran en la tabla 6.

Tabla 6. Parámetros cinéticos de la LAPyspII recombinante y LAPyspII nativa.

	K_m (mM)	V_{max} (nmol/min)	k_p (min ⁻¹)	Eficiencia cinética k_p/K_m (M ⁻¹ seg ⁻¹)
LAPyspII nativa (Herrera-Camacho,2007) ⁶⁹	4.5	280	1.79×10^5	6.6×10^5
LAPyspII recombinante	0.45	180.0	9.4×10^4	3.4×10^6

Cabe recordar que los parámetros cinéticos de la LAPyspII nativa fueron determinados con la enzima purificada en su forma hexamérica, en cambio la LAPyspII recombinante que obtuvimos está en su forma monomérica activa.

La K_m de la LAPyspII recombinante es alrededor de 10 veces menor en comparación con la nativa, sin embargo la LAPysp nativa presenta un valor mayor de velocidad máxima (V_{max}), 64 % más alto y constante de velocidad de recambio (k_p), 100% más alta que la recombinante. Con respecto a la recombinante. El hecho de tener una K_m más pequeña en la recombinante es indicativo de que tiene una mayor afinidad por el sustrato, posiblemente cuando la enzima está como monómero tenga más flexibilidad entrando con mayor facilidad el sustrato al sitio activo, sin embargo la forma nativa hexamérica es más rápida en la segunda etapa donde el sustrato se transforma a producto teniendo mayor V_{max} y k_p , sugiriendo que la forma hexamérica puede estar estabilizando mejor la estructura.

Para poder evaluar de forma global estos parámetros calculamos la eficiencia cinética (EF) que nos da una relación entre la rapidez de la reacción y la afinidad (k_p/K_m). A pesar que la EF es 5 veces mayor en la recombinante que en la nativa (tabla 6) esta diferencia no es significativa, se requieren diferencias de por lo menos de un orden de magnitud 10 veces para considerar un cambio importante² por lo que podemos decir que la LAPyspII recombinante y nativa son parecidas en su eficiencia cinética.

6.7. Determinación de metales por el método de PIXE

Estudios precedentes mostraron que la LAPyspII es dependiente de iones Mn^{2+} y que el Zn^{2+} es un inhibidor de la catálisis (2007 Herrera y cols.)⁶⁹, también se llevaron a cabo experimentos con la enzima desmetalizada (2009 Rivera Angeles)⁷⁰ observando que con Mn^{2+} se recuperó hasta el 80% de la actividad enzimática mientras que con Zn^{2+} no se logró recuperar la actividad enzimática. Para avanzar en el conocimiento del metal o metales que forman parte de la estructura molecular de la LAPyspII se utiliza el análisis de metales por el método de PIXE, siendo una técnica de rayos X potente, pero no destructiva⁸³. Este análisis se realiza en el Instituto de Física de la UNAM con el Dr. José Luis Ruvalcaba.

El análisis de PIXE tiene la ventaja que se realiza en las proteínas que se separan en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (PAGE-SDS). Para llevar a cabo la determinación de metales se necesitan por lo menos 10 μg de proteína purificada. Por ello se hizo un gel con diferentes concentraciones de la LAPyspII recombinante purificada (10, 20, 30, 40 μg), la banda horizontal donde está la enzima recombinante se deshidrata a temperatura ambiente y se envía al análisis por PIXE. Las proteínas no se deben teñir y por lo tanto no se pueden observar, por esa razón las muestras se ponen en la mitad de un gel y se envían para su análisis, mientras que en la otra mitad se pone la misma muestra para tinción (5 y 40 μg). Para tener la referencia del lugar exacto donde se encuentra la proteína para el análisis. En la figura 19 se muestra la mitad el gel con la proteína teñida, una alícuota con la elución final y la otra alícuota, donde la concentración de proteína es mayor después de la liofilización.

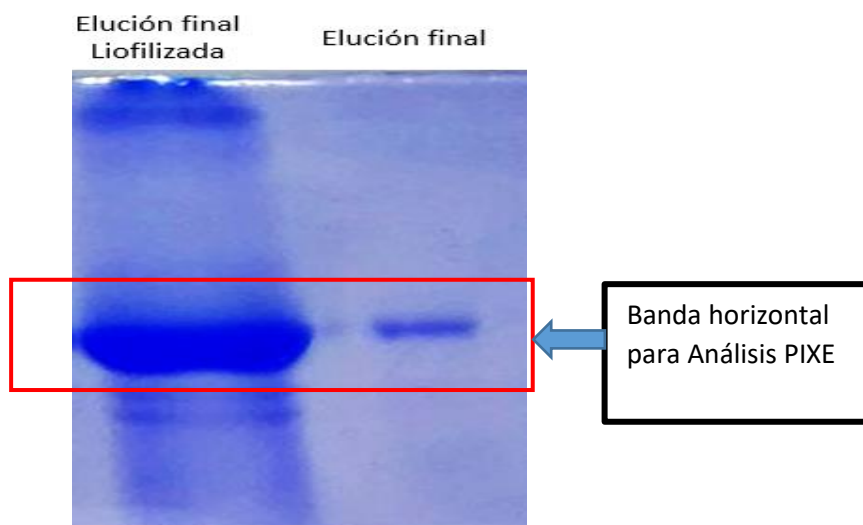


Figura 19. PAGE-SDS de la proteína LAPyspII recombinante para cuantificar el metal por el método de PIXE.

Carril 1: Elución final liofilizada (40 μg).

Carril 2: Elución final (5 μg).

Cabe mencionar que para esta determinación de metales por análisis PIXE se enviaron las muestras de la LAPyspII recombinante al Instituto de Física de la UNAM con el Dr. José Luis Ruvalcaba el 29 de agosto del 2017.

7. CONCLUSIONES

- Las condiciones óptimas de sobreproducción de la LAPyspII recombinante se obtienen en el 4° día de expresión con 1 % de metanol como inductor
- El método de purificación IMAC es un buen método para la purificación de la LAPyspII recombinante, ya que la proteína se obtiene con un rendimiento mayor al 30 %, obteniendo una preparación homogénea con alto grado de pureza.
- En los parámetros cinéticos se observa que la LAPyspII recombinante que tiene una estructura monomérica, si bien tiene una mejor afinidad (K_m) por el sustrato, su velocidad y número de recambio (V_{max} y k_p) son menores en comparación con la LAPyspII nativa, la cual tiene una estructura hexamérica. La eficiencia cinética (k_p/K_m) es muy parecida en las dos enzimas

8. PERSPECTIVAS DEL TRABAJO

- En futuros experimentos se podrán usar las condiciones de sobreexpresión y purificación con IMAC-NTA-Ni²⁺ para obtener la proteína pura a altas concentraciones que permitan hacer un estudio cristalográfico de la LAPyspII recombinante y confirmar su estructura molecular y sitio catalítico.
- Es importante conocer mejor el sitio catalítico de la enzima, para ello se puede realizar una mutagénesis en los aminoácidos que se sabe que juegan un papel importante dentro de este sitio, como lo es la Lys-293 y de esta forma determinar si los parámetros cinéticos K_m , V_{max} y k_p se modifican al cambiar un aminoácido.

9. BIBLIOGRAFÍA

- [1]Luque Guillén Victoria Estructura y propiedades de las proteínas [monografía en internet] Valencia España; Universidad de Valencia [consultado 15-Septiembre-2017]. Disponible en: <http://www.bionova.org.es/biocast/documentos/tema08.pdf>.
- [2]Lehniger Albert L, Nelson David L, Cox Michael M. (2003). Lehniger principles of biochemistry. 5° Ed. Omega.
- [3]Lodish Harvey y cols. (2000). Molecular Cell Biology.2° Ed. New York; H.W. Freeman and Company.
- [4]Time, J.C., Enoksson, M., Wildfang, E., Zhu W., Igarashi, Y. y cols. (2007).Profiling constitutive proteolytic events in vivo. *Biochemical Journal*; 407: 41-48.
- [5]Bastians, H., Topper, L. M., Gorbski, G. L., Ruderman J. V. (1999) Cell Cycle-Regulated Proteolysis of Mitotic Target Proteins. *Molecular Biology of the Cell*; 10 (11):3927-3941.
- [6]Lopez-Otín, C. y Overall, M. C. (2002). Protease degradomics: a new challenge for proteomics. *Nature reviews, molecular cell Biology*, 509-518.
- [7]Schoenheimer, R. (1942). The dynamic stage of body constituents. Harvard University Press, Cambridge.
- [8]Mathews, C., Van Holde, K. E., Ahern K. G. (2002). Bioquímica. 3° Ed. Wesley Coghman.
- [9]Chondrogianni N., Fragoulis E. G. and Gonos E. D. (2002). Protein degradation during aging: the lysosome-, the calpain- and the proteasome- dependent cellular proteolytic system. *Biogerontology*: 121-123.
- [10]Schimke, R.T, Doyle D. (1970). Control of enzyme levels in animal tissues. *Ann Rev. Biochem.* 26:103-106
- [11]Lenk, U., Sommer, T. (2000). Ubiquitin-mediated proteolysis of a short-lived regulatory protein depends on its cellular localitation. *J. of Biol. Chem.* 275: 39403-39410.
- [12]Klionsy, D. J. (2000). Autophagy, cytoplasm-to-vacuole targeting pexophagy in yeast and mammalian cell. *Ann Rev. Biochem.* 69:303-342.
- [13]Wilkinson, C. R, y cols. (1999). the 26S proteasome of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Philos Trans R Soc Lond B. Biol Sci.* 29: 1523-1532.
- [14]Atáix, D., Combaret, L., Pouch, M.N. y Taillandier, D. (2002) Cellular control of ubiquitin proteasome-dependent proteolysis. *J. Anim. Sci.* 80: E56-E63.
- [15]Dice, J.P. (1996). Peptide sequence that target cytosolic proteins for lysosomal proteolysis. *Trend. Biochem. Sci.* 15:305-309.
- [16]Stadtman, E. y cols. (2004). Methionine oxidation and aging *6*:136-138.
- [17]Mofers, A., Pellegrini, P., Linder, S. y cols. (2017). *Cancer Metastasis Rev.* doi.org/10.1007/s10555-017-9697-6.
- [18]Haas de Mello, A, Costa A. B., Giustina, E. J. D, Tezza, R. G. (2017) Mitochondrial dysfunction in obesity *Rev.*doi.org/10.1016/j.lfs.2017.11.019.

- [19] Spencer, M.L, Theodosiou, M, Noonan, D.J. (2004). NPDC-1, a novel regulator of neuronal proliferation, is degraded by the ubiquitin/proteasome system through a PEST degradation motif. *J. Biol. Chem.* 279 (35): 37069-78.
- [20] Starkova, N.N, Koroleva E.P. y Rotanova, T.V. (1999). Intracellular proteolysis: signal of selective protein degradation. *Russian Journal of Bioorganic chemistry*, 71-84.
- [21] Matthew, I. y Gary, K. S. (2017). Cell-Cycle Therapeutics Come of Age *Journal of Clinical Oncology* 35:25, 2949-2959. doi.org/10.1200/JCO.2016.69.0032.
- [22] Taylor, P. D., Toseland, C. P., Attwood, T. K., & Flower, D. R. (2006). TATP red: a Bayesian method for the identification of twin arginine translocation pathway signal sequences. *Bio information*, 1(5), 184–187.
- [23] Cai, Z., Zeng, W., Tao, K., Zhen, E., Wang, B. y Yang, Q. (2015). Autofagia mediada por chaperonas: roles en la neuroprotección. *Neurociencia Boletín*, 31 (4), 452-458. doi.org/10.1007/s12264-015-1540-x.
- [24] Neurath, H. (1984). Evolución of proteolytic enzymes. *Science*. 2(24):350- 357.
- [25] Sergey A. Shiryaev, Alex Y. Strongin. (2014). Proteolysis is the irreversible post-translational modification affecting a specific peptide bond in a target protein substrate. *J. Proteolysis Vol 1, No 1* (2014); doi:10.13176/14.609
- [26] Rodríguez López J. N. (2003). Proteólisis intracelular: Recambio proteico. Tesis de licenciatura. España.
- [27] Burley, S., David, P., y Lipscomb, W. (1991). Leucina Aminopeptidasa-Inhibición de Bestatina y un modelo para hidrólisis de péptidos catalizados por enzimas, *Proc Natl Acad Sci USA* 88 ,6916.
- [28] Leucina aminopeptidasas [monografía en internet]; Worthington Biochemical Corporation. [Consultado 30-October-2017]. En <http://www.worthington-biochem.com/lapc/images/reaction.jpg>
- [29] Mercado-Flores, Y., Noriega- Reyes, Y., Ramírez- Zavala, B., Hernández-Rodríguez, C. y Villa-Tanaca, L. (2004). Purification and characterization of Aminopeptidase (pumAPE) from *Ustilago maydis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 235: 369- 375.
- [30] Sanz, Y. 2007. Aminopeptidase. *Industrial Enzymes*, Springer. 243-260.
- [31] Chaerkady, R: y Shrama K. K. (2004). Characterization of a bradykinin-hidrolizing protease from the bovine lens. *Invest Ophthalmol*; 45:1214-1223.
- [32] Albrecht S, Al-Lakkis-Wehbe M, Orsini A, Defoin A., Pale P, Salomon E, Tarnus C, Weibel J. M.(2011). Amino-benzosuberone: a novel warhead for selective inhibition aminopeptidase-N/CD13. *Biorg Med Chem*; 19:1434-1449.
- [33] Changklugmoa, N, Kuekhai, P, Riengrojpitak y cols. (2013) Immunization with recombinant leucine aminopeptidase showed protection against *Fasciola giant* in mice. *Parasitological Resueste*; 112:3653-3659.
- [34] Strater N, Sherrat D. J & Collons SD (1999) X-ray structure of aminopeptidase A from *Escherichia coli* and a model for the nucleoprotein complex in Xer-site specific recombination. *EMBO J* 18, 4513–4522.

- [35] Charlier, D., Kholti A., Huysveld, N., Gigot, D., Maes, D., Thia-toong, T.L., Glansdorff, N. (2000). Mutational analysis of *Escherichia coli* Pep A, a multifunctional DNA binding aminopeptidase. *J Mol Biol* 302, 411–426.
- [36] Ishizaki, T., Tosaka A., Nara, T., Aoshima, N., Namekawa, S., Watanabe K., Hamada F., Omori, A. & Sakaguchi, K. (2002) Leucine aminopeptidase during meiotic development. *Eur J Biochem* 269, 826–832.
- [37] Kurtzman, C. P., Fell, J. W., Boekhout, T. (2011). Ed. The yeast a taxonomic study. Elsevier. p. 3. ISBN 978-0-123-84708-9.
- [38] Mitsuhiro, Y. (2003). The model unicellular eukaryote, *Schizosaccharomyces pombe*. *Genome Biol.* 3(3):1-2003.4.
- [39] Sipiczki, M. (2000). Where does fission yeast sit on the tree of life. *Genome Biol.* 1:1011.1-1011.4
- [40] Eisen, Jonethan A. (2002). Brouhaha over other yeast. *Nature.* 415:845-847
- [41] Wixon, J. (2002). Featured organism: *Schizosaccharomyces pombe*, the fission yeast. *Comp funct Genom*; 3: 194-204.
- [42] Brunner, D, Nurse, P. (2000). New concepts in fission yeast morphogenesis. *Philosophical Transactions B*; 355: 873-877.
- [43] Ciencias Biológicas [monografía en internet]; Universidad de Alabama. EUA. [Consultado 22-Noviembre-2017]. Disponible en: <https://bsc.ua.edu/profiles/stevan-marcus>.
- [44] Regidor-Cerillo, J. (2001). Estudio de la expresión del receptor mGluR1a del Sistema Nervioso Central de *Rattus norvegicus* en la levadura *Schizosaccharomyces pombe* y líneas celulares de mamífero. Tesis de doctorado. Facultad de farmacia. Departamento de microbiología de la Universidad Complutense de Madrid, España.
- [45] Xue-Franzén, Y., Kjaerulff, S., Holmberg, C., Wright, A. and Nielsen, O. (2006). Genome wide identification of pheromone-targeted transcription in fission yeast. *BMC Genomics* 2006, 7:303.1-18.
- [46] Wilkinson, C.R.M., Penney, M., McGurk G., Wallace, M. y Collin, G., (1999). The 26S proteasome of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Phill. Trans, R. Soc. Lond. B.* 354: 1523-1532.
- [47] Suárez-Rendueles, P., Villa, L., Arbesú M. J., Escudero B. (1991). The proteolytic system of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *FEMS Microbiol. Lett.* 81:215-220.
- [48] Lin, C.T., Moore, P.A., Auberry, D.L., Landorf, E.V., Peppler, T., Victry, K.D., Collart, F.R., Kery, V. (2006). Automated purification of recombinant proteins: combining highthrough put with high yield. *Protein Expression and Purification.* 47(1): 16-24.
- [49] Wingfield, PT (2015). Descripción general de la purificación de proteínas recombinantes. *Protocolos actuales en Protein Science / Editorial Board.* 80, 6.1.1-6.1.35. doi.org/10.1002/0471140864.ps0601s8.
- [50] Guerrero-Olazarán, M., Cab-Barrera, E. Galán-Wong, L.J., Viader-Salvador, J.M. (2004). Biotecnología de proteínas para la aplicación en acuicultura. *Memorias del VII Simposio Internacional de Nutrición Acuícola.* Hermosillo, Sonora, México.

- [51] Perspectivas actuales del uso de proteínas recombinantes y su importancia en la investigación científica e industrial. *Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud*. (2014) Universidad de Sonora, volumen XV, número 3.
- [52] Waugh, D. S. (2005.) Making the most of affinity tags. *Trends in Biotechnology*. 23(6):316-320.
- [53] Guerrero-Ramírez, G. I. (2015). Producción de la proteína E2 del virus del papiloma humano tipo 16 en la levadura *Pichia pastoris*. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina. Universidad de Nuevo León, México.
- [54] Márquez –Ipiña, A. R. (2012). Establecimiento de un método de purificación de proteínas recombinantes, basado en etiquetas de histidina, producidas en *Pichia pastoris*. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina. Universidad de Nuevo León, México.
- [55] De Schutter, K., Lin, Y.C., Tiels, P., Van Hecke, A., Glinka, S., Weber-Lehmann, J., Rouzé, P., Van de Peer, Y., Callewaert, N. (2009). Genome sequence of the recombinant protein production host *Pichia pastoris*. *Nature Biotechnology*. 27(6):561-566.
- [56] He, Y., Wang, K., & Yan, N. (2014). The recombinant expression systems for structure determination of eukaryotic membrane proteins. *Protein & Cell*, 5(9), 658–672. doi.org/10.1007/s13238-014-0086-4.
- [57] Demian, A.L., Adrio, J.L. (2008). Contributions of microorganisms to industrial biology. *Molecular Biotechnology*. 38:41-55.
- [58] Frey, S. T., Guilmet, S. L., Egan, R. G., Bennett, A., Soltau, S. R., & Holz, R. C. (2010). Immobilization of the Aminopeptidase from *Aeromonas Proteolytica* on Mg²⁺/Al³⁺ Layered Double Hydroxide Particles. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2(10), 2828–2832. doi.org/10.1021/am1005095.
- [59] Julien, C. (2006) Production of humanlike recombinant proteins in *Pichia pastoris*, from expression vectors to fermentative strategy. *Bioprocess International*; 4 (1):22-31.
- [60] Arnau, J., Lauritzen, C., Petersen, G.E., Pedersen, J. (2006). Current strategies for the use of affinity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins. *Protein expression and purification*. 48: 1-13.
- [61] Lichty, J.J., Malecki, J.L., Agnew, H.D., Michelson-Horowitz, D.J., Tan, S. (2005). Comparison of affinity tags for protein purification. *Protein Expression and Purification* 41:98-105.
- [62] McCluskey, A.J., Poon, G.M.K., Gariépy, J. (2007). A rapid and universal tandem purification strategy for recombinant proteins. *Protein Science*. 16:2726-2732.
- [63] Abyntek. (2017). *Tags para la purificación de proteínas recombinantes*. [http://www.abyntek.com/tags-purificacion-de-proteinas-recombinantes].
- [64] Hemdan, E.S., Zhao, Y.J., Sulkowski, E., Porath, J. (1989). Surface topography of histidineresidues: a facile probe by immobilized metal ion affinity chromatography. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 86:1811-1815.

- [65] Block, H., Maertens, B., Sproestersbach, A., Brinker, N., Kubicek, J., Fabis, R., Labahn, J., Schäfer, F. (2009). Immobilized-metal affinity chromatography (IMAC): a review. *Methods Enzymol.* 463:439-743.
- [66] Luévano de la Cruz A. (2011). Producción, purificación y bioensayo de prolactinas recombinantes. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina. Universidad de Nuevo León, México.
- [67] Knecht, S., Ricklin, D., Eberle, A. N., Ernst, B. (2009). Ologohis-tags: mechanisms of binding to Ni²⁺-NTA surfaces. *Journal of Molecular Recognition.* 22:270-279.
- [68] Hemdan, E.S., Zhao, Y.J., Sulkowski, E., Porath, J. (1989). Surface topography of histidine residues: a facile probe by immobilized metal ion affinity chromatography. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 86:1811-1815.
- [69]. Herrera-camacho I, Rosas-Murrieta N, Rojo- Dominguez A, Millán L, Reyes-Leyva J, Santos-López, Suárez- Rendueles P. (2007). Biochemical characterization and structural prediction of a novel cytosolic leucyl aminopeptidase of the M17 family from *Schizosaccharomyces pombe*. *FEBS journal.* 274: 6228-6240.
- [70]. Rivera, J. A. Leucín aminopeptidasa yspII de *Schizosaccharomyces pombe*. Sobreproducción, Purificación, estudio cinético de competición de iones y modelado del dominio N-terminal. (2009). [Tesis de Maestría]. Puebla, México: BUAP, Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular ICUAP.
- [71] Invitrogen. EasySelect Pichia Expression kit. (2009) 1° Ed. Invitrogen Corporation.
- [72] Phillips, Edwin R., Dennis-James, W., Elliott- Bruce, E., Kerbel-Robert. S. (1982). A new method for the preparation of solid-phase immune-adsorbents. *Analytical Biochem.* 121:83-90.
- [73] Julien, C. (2006). Production of humanlike recombinant proteins in Pichia Pastoris, from expression vectors to fermentative strategy. *Bioprocess International*; 4 (1):22-31.
- [74] Knecht, S., Ricklin, D., Eberle, A. N., Ernst, B. (2009). Ologohis-tags: mechanisms of binding to Ni²⁺-NTA surfaces. *Journal of Molecular Recognition.* 22:270-279.
- [75] Sedmak J. J, Grossberg S.E. (1977). A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G-250. *Biochem.* 79:544.552.
- [76] Precipitación de proteínas [monografía en internet]; Universidad Autónoma Metropolitana, México. [Consultado 29-Septiembre-2017]. Disponible en: <http://sgpwe.izt.uam.mx/files/users/uami/sho/Precipitacion.pdf>.
- [77] MANUAL DE LIOFILIZACIÓN, TERRONI EQUIPAMENTOS LTDA [consultado 02- Octubre-2017]. Disponible en: <http://api.ning.com/files/r36cjGKKUjHiYZQHNM080UEkCPVAiIYsidNyI15yUYIQDC H8ViroxVYM2-kcxgYLQl1ef39s4YrkKVgvtRESq2U/ManualdeliofilizacinEsp.pdf>.
- [78] García-Pérez, H. M. (2000) Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. *Universo diagnóstico*; 1 (2): 31-41.

- [79] Precipitación de proteínas [monografía en internet]; Universidad Autónoma, México. [Consultado 22-Septiembre-2017]. Disponible en: http://sgpwe.izt.uam.mx/files/users/uami/favela/tejeda_cap_9.pdf
- [80] Mahmood, T., & Yang, P.-C. (2012). Western Blot: técnica, teoría y solución de problemas. *Revista Norteamericana de Ciencias Médicas*, 4 (9), 429-434. doi.org/10.4103/1947-2714.100998
- [81] Andvansta. Analisis de proteínas. (2009) Electroforesis, transferencia e Inmunodetección. Anvansta Corporation.
- [82] Berg, J. M., Tymoczko J.L., Stryer, L. (2002). The Michaelis-Menten Model Accounts for the Kinetic Properties of Many Enzymes. *Biochemistry*. 5th edition. New York: W H Freeman. Section 8.4.
- [83] S.A.E. Johansson y J.L. Campbell. (2017). PIXE [monografía en internet]; Universidad de harvard. [Consultado 10-Octubre-2017]. Disponible en: <http://www.mrsec.harvard.edu/cams/PIXE.html>
- [84] Zhongmei, L., Xinxing G., Li Z., Wenjing C., Yaping T., Zhemin Z. (2016). An extracellular aminopeptidase encoded by the ywaD gene plays an important role in supplying nitrogen nutrition for the growth of *Bacillus subtilis* 168. *Canadian Journal of microbiology*, 63, 516-524.
- [85] Vici, A. C., da Cruz, A. F., Facchini, F. D. A., de Carvalho, C. C., Pereira, M. G., Fonseca-Maldonado, R. Polizeli, M. L. T. M. (2015). *Beauveria bassiana* Lipase A expressed in *Komagataella (Pichia) pastoris* with potential for biodiesel catalysis. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1083.
- [86] Flores, T. G. (2015) Leucín aminopeptidasa yspII recombinante: condiciones óptimas de sobreproducción en la levadura *Pichia pastoris*, peso molecular y purificación [Tesis de licenciatura]. Puebla, México: BUAP, Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular ICUAP.
- [87] Bornhorst, J. A. y Falked, J.J., (2000). Purification of proteins Using Polyhistidine Affinity Tags. *NIH-PA. Methods Enzymol*; 326:245-254.
- [88] Serrano-Rivero, Y.; Marrero-Domínguez, K.; Fando-Calzada, R. (2016) *Pichia pastoris*: una plataforma para la producción de proteínas heterólogas. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, vol. 47, pp. 67-77 Centro Nacional de Investigaciones Científicas Ciudad de La Habana, Cuba.
- [89] Wang, K.D., Wang, K.H., Zhou, N.D. y cols. (2017). *Appl Biochem Biotechnol* 181: 1611. doi.org/10.1007/s12010-016-2305-3.
- [90] Lin, C.T. y col. (2006). Automated purification of recombinant proteins: combining high throughput with high yield. *Protein Expression and Purification*. 47(1): 16-24.
- [91] Correa, A. F., Bastos, I. M. D., Neves, D., Kipnis, A., Junqueira-Kipnis, A. P., & de Santana, J. M. (2017). The Activity of a Hexameric M17 Metallo-Aminopeptidase Is Associated with Survival of *Mycobacterium tuberculosis*. *Frontiers in Microbiology*, 8, 504. doi.org/10.3389/fmicb.2017.00504.

- [92]Cerriteño-Sánchez, J.L., Santos-López, G., Rosas-Murrieta, N.H., Reyes-Leyva, J., Cuevas-Romero, S., Herrera-Camacho, I. (2016). Production of an enzymatically active and immunogenic form of ectodomain of porcine rubulavirus hemagglutinin-neuraminidase in the yeast *Pichia pastoris*. *Journal of Biotechnology* 223, 52 – 61 pp.