

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES DULCES,
MODIFICADORAS DEL SABOR Y PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS EN
Escherichia coli

POR
MC. JESSICA JUDITH GÓMEZ LUGO

Como requisito parcial para obtener el Grado de DOCTORADO EN CIENCIAS
con Orientación en Microbiología Aplicada

Mayo, 2024

PRODUCCION DE PROTEINAS RECOMBINANTES DULCES,
MODIFICADORAS DEL SABOR Y PEPTIDOS ANTIMICROBIANOS EN
Escherichia coli

REVISIÓN DE LA TESIS:



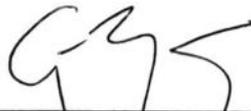
Dr. Xristo Zárate Kalfópulos
ASESOR



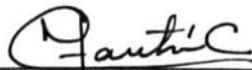
Dra. Alma Elizabeth Gómez Loredó
COMITÉ TUTORIAL



Dra. Melissa Marlene Rodríguez Delgado
COMITÉ TUTORIAL



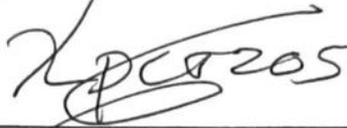
Dr. Jesús Alberto Gómez Treviño
COMITÉ TUTORIAL



Dra. María Elena Cantú Cárdenas
SUB-DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES DULCES,
MODIFICADORAS DEL SABOR Y PEPTIDOS ANTIMICROBIANOS EN
Escherichia coli

APROVACIÓN DE LA TESIS:



Dr. Xristo Zárate Kalfópulos
PRESIDENTE



Dra. Alma Elizabeth Gómez Loredó
SECRETARIO



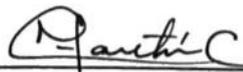
Dra. Melissa Marlene Rodríguez Delgado
PRIMER VOCAL



Dr. Néstor Guadalupe Casillas Vega
SEGUNDO VOCAL (EXTERNO)



Dr. Sergio Arturo Galindo Rodríguez
TERCER VOCAL (EXTERNO)



Dra. María Elena Cantú Cárdenas
SUB-DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
CAPÍTULO 1	16
1. INTRODUCCIÓN	16
1.1 Enlaces disulfuro.....	16
1.2 Proteínas de fusión.....	18
1.3 Proteínas con enlaces disulfuro.....	22
1.3.1 Proteínas dulces y modificadoras del sabor	22
1.3.2 Péptidos antimicrobianos	24
1.3.3 Producción en tándems	27
1.4 Justificación	29
CAPÍTULO 2	30
2. ANTECEDENTES.....	30
2.1 Aportación científica.....	34
CAPÍTULO 3	36
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	36
3.1 Hipótesis	36
3.2 Objetivo General.....	36
3.3 Objetivos Específicos	37
CAPÍTULO 4	38
4. METODOLOGÍA.....	38
4.1 Materiales, reactivos y equipo	38
4.2 Metodología General.....	40
4.3 Síntesis de Genes.....	41
4.4 Amplificación de Insertos	41
4.5 Construcción de plásmidos.....	42
4.5.1 Digestión de los plásmidos pET30a(+)_CusF3H+ y pET30a(+)_SmbP	43
4.5.2 Ligación.....	45
4.5.3 Transformación en <i>E. coli</i> DH5 α	46
4.5.4 Selección de transformantes y extracción de ADN plasmídico.....	46
4.5.5 Confirmación de insertos por PCR.....	46
4.6 Expresión de Proteínas	47
4.6.1 Transformación en <i>E. coli</i> SHuffle T7 express.....	47
4.6.2 Microexpresión.....	48
4.6.3 Escalamiento de la expresión de proteínas	49
4.7 Purificación de Proteínas	49
4.7.1 Lisis celular y obtención de clarificados.....	49
4.7.2 Purificación: Cromatografía por Afinidad	50
4.7.3 Diálisis para la remoción de imidazol y NaCl	50
4.7.4 Cuantificación de Proteínas	51

4.7.5 Remoción de tag.....	51
4.7.6 Purificación: Cromatografía por Intercambio Aniónico.....	52
4.8 Evaluación de la actividad.....	52
4.8.1 Actividad Dulce – Brazzein.....	52
4.8.2 Actividad Modificadora del sabor – Miraculin.....	53
4.8.3 Actividad Antimicrobiana – Hecpidin, Scygonadin y Rattusin	53
CAPÍTULO 5.....	55
5. RESULTADOS.....	55
5.1 Síntesis de genes.....	55
5.2 Clonación	57
5.2.1 Construcciones con las proteínas de fusión CusF3H+, SmbP y PelB_SmbP.....	57
5.2.2 Amplificación de Miraculin	58
5.2.3 Confirmación del inserto miraculin en la construcción CusF3H+_Miraculin	59
5.2.4 Confirmación del inserto Brazzein en la construcción SmbP_Brazzein	60
5.3 Expresión de Proteínas	61
5.3.1 Microexpresión de CusF3H+_Brazzein y CusF3H+_Miraculin.....	61
5.4 Purificación de Proteínas	62
5.4.1 Cromatografía IMAC: CusF3H+_Brazzein.....	62
5.4.2 Cromatografía por Intercambio Aniónico: CusF3H+_Brazzein	66
5.5 Cuantificación de Proteínas	68
5.5.1 Cuantificación de: CusF3H+_Brazzein.....	68
5.6 Remoción del tag.....	69
5.7 Microexpresión de SmbP_Brazzein	70
5.8 Purificación SmbP_Brazzein: IMAC.....	73
5.9 Digestión con enteroquinasa y remoción del tag.....	73
5.10 Evaluación de la actividad.....	77
5.11 Purificación de proteínas	77
5.11.1 Cromatografía IMAC: CusF3H+_MCL	77
5.12 Solubilización de CusF3H+_MCL	79
5.12.1 Tratamiento con lisozima y lisozima/triton X-100 y lisis celular	79
5.12.2 Tratamiento con NaCl y triton X-100	80
5.12.3 Extracción por congelación/descongelación y detergentes iónicos	82
5.13 Expresión de CusF3H+_MCL en <i>E. coli</i> Origami2(DE3).....	83
5.14 Expresión en NativeFolder™	84
5.15 Purificación de SmbP_MCL expresada en Native Folder™	85
5.15.1 Purificación IMAC.....	86
5.16 Remoción del tag: cromatografía por intercambio aniónico.....	89
5.17 Evaluación de la actividad de MCL.....	89
5.18 Clonación	90
5.18.1 CusF3H+_Scygonadin, SmbP_Scygonadin y PelB_SmbP_Scygonadin.....	90
5.19 Microexpresión de CusF3H+_Scygonadin, SmbP_Scygonadin y PelB_SmbP_Scygonadin.....	90
5.20 Expresión y purificación IMAC: CusF3H+_Scygonadin y SmbP_Scygonadin.....	92

5.21 Digestión con enteroquinasa y remoción del tag: CusF3H+_Scygonadin y SmbP_Scygonadin.....	95
5.22 Evaluación de la actividad de Scygonadin	96
5.23 Clonación por tándems: Brazzein3xNG, Rattusin2xNG y Rattusin3xNG.....	97
5.23.1 Síntesis de genes y clonación	97
5.23.2 Confirmación de insertos: construcciones con CusF3H+ y SmbP.....	100
5.24 Microexpresión de tándems.....	105
5.25 Purificación SmbP_Brazzein3xNG	105
5.25.1 Cromatografía IMAC	106
5.26 Digestión química con hidroxilamina.....	107
5.27 Remoción del tag: cromatografía por intercambio aniónico.....	109
5.28 Evaluación de la actividad: Brazzein3xNG	110
5.29 Clonación por tándems con uniones flexibles: Brazzein FLEX, Scygonadin FLEX y Hepcidin FLEX.....	111
5.29.1 Síntesis de genes y clonación	111
5.30 Microexpresión en <i>E. coli</i> SHuffle de proteínas FLEX.....	114
5.30.1 CusF3H+_Brazzein FLEX, SmbP_Brazzein FLEX, PelB_SmbP_Brazzein FLEX.....	115
5.30.2 CusF3H+_Scygonadin FLEX, SmbP_Scygonadin FLEX, PelB_SmbP_Scygonadin FLEX	116
5.30.3 CusF3H+_Hepcidin FLEX, SmbP_Hepcidin FLEX, PelB_SmbP_Hepcidin FLEX.....	119
5.31 Expresión y purificaciones de proteínas FLEX: IMAC.....	119
5.31.1 CusF3H+_Brazzein FLEX y SmbP_Brazzein FLEX.....	119
5.31.2 CusF3H+_Hepcidin FLEX y SmbP_Hepcidin FLEX.....	121
5.31.3 CusF3H+_Scygonadin FLEX y SmbP_Scygonadin FLEX	122
5.32 Digestión con enteroquinasa y remoción del tag.	125
5.32.1 CusF3H+_Brazzein FLEX y SmbP_Brazzein FLEX.....	125
5.32.2 SmbP_Hepcidin FLEX.....	127
5.32.3 CusF3H+_Scygonadin FLEX y SmbP_Scygonadin FLEX	128
5.33 Evaluación de la actividad de Scygonadin FLEX	130
CAPÍTULO 6.....	133
6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	133
CAPÍTULO 7.....	146
7. CONCLUSIONES.....	146
CAPÍTULO 8.....	149
8. PERSPECTIVAS.....	149
Referencias Bibliográficas	150

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Secuencia de nucleótidos y aminoácidos que codifican para la proteína de fusión CusF3H+.....	20
Tabla 2. Secuencia de nucleótidos y aminoácidos que codifican para la proteína de fusión SmbP.....	21
Tabla 3. Secuencia de nucleótidos y aminoácidos que codifican para la proteína de fusión SmbP con el péptido señal PelB (PelB_SmbP)	22
Tabla 4. Oligonucleótidos usados para la amplificación de Miraculin.....	41
Tabla 5. Componentes y condiciones para la amplificación de Miraculin.....	42
Tabla 6. Lista de construcciones	43
Tabla 7. Componentes y condiciones para la digestión de los plásmidos pET30a(+)_CusF3H+ y pET30a(+)_SmbP	44
Tabla 8. Componentes y condiciones para la digestión del inserto	44
Tabla 9. Componentes y condiciones para la ligación	45
Tabla 10. Componentes y condiciones para la confirmación de insertos	47
Tabla 11. Secuencia de nucleótidos y aminoácidos que codifican para Brazzein	55
Tabla 12. Secuencia de nucleótidos y aminoácidos que codifican para Miraculin.....	56
Tabla 13. Secuencia de nucleótidos y aminoácidos que codifican para scygonadin	57
Tabla 14. Datos de la curva de calibración para la cuantificación de	68
Tabla 15. Condiciones del tratamiento para CusF3H+_MCL con triton X-100 y NaCl.	82
Tabla 16. Muestras de microexpresión a diferentes condiciones de PelB_SmbP_Scygonadin, CusF3H+_Scygonadin y SmbP_Scygonadin.	91
Tabla 17. Secuencia de nucleótidos y aminoácidos que codifican para Brazzein3xNG.....	98
Tabla 18. Secuencia de nucleótidos y aminoácidos que codifican para Rattusin2xNG.....	99
Tabla 19. Secuencia de nucleótidos y aminoácidos que codifican para Rattusin3xNG.....	99
Tabla 20. Tratamientos de expresión en <i>E. coli</i> SHuffle y lisis celular para las proteínas SmbP_Brazzein3xNG, SmbP_Rattusin2xNG y SmbP_Rattusin3xNG.....	103
Tabla 21. Tratamientos de expresión en <i>E. coli</i> Origami2(DE3) y lisis celular para las proteínas SmbP_Brazzein3xNG, SmbP_Rattusin2xNG y SmbP_Rattusin3xNG.	104
Tabla 22. Secuencia de nucleótidos y aminoácidos que codifican para Brazzein FLEX.....	112
Tabla 23. Secuencia de nucleótidos y aminoácidos que codifican para Scygonadin FLEX	113
Tabla 24. Secuencia de nucleótidos y aminoácidos que codifican para Hecpidin FLEX	114
Tabla 25. Muestras de microexpresión a diferentes condiciones de PelB_SmbP_Brazzein FLEX, CusF3H+_Brazzein FLEX y SmbP_Brazzein FLEX.	116
Tabla 26. Muestras de microexpresión a diferentes condiciones de PelB_SmbP_Scygonadin FLEX, CusF3H+_Scygonadin FLEX y SmbP_Scygonadin FLEX.	117
Tabla 27. Muestras de microexpresión a diferentes condiciones de PelB_SmbP_Hecpidin FLEX, CusF3H+_Hecpidin FLEX y SmbP_Hecpidin FLEX.....	118
Tabla 28. Resumen de resultados reportados en el proyecto.	131

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Formación de enlaces disulfuro en el periplasma de <i>Escherichia coli</i> . Berkmen (2012).....	17
Figura 2. Estructura secundaria de CusF. PDBE (2018)	19
Figura 3. Estructura secundaria de SmbP. PDBE (2020).....	21
Figura 4. Estructura secundaria de Brazzein. PDBE (2018).	23
Figura 5. Estructura secundaria de Miraculin. PDBE (2018)	24
Figura 6. Estructura secundaria de Rattusin. PDBE (2018)	25
Figura 7. Estructura secundaria de Hepcidin. PDBE (2018)	26
Figura 8. Estructura secundaria de Scygonadin. Biozentrum (2020)	27
Figura 9. Representación de las construcciones utilizando el plásmido pET30a(+). La proteína de fusión ya sea CusF3H+, SmbP o PelB_SmbP se clonaron entre los sitios de restricción NdeI (naranja) y KpnI (verde). El sitio de reconocimiento de la enteroquinasa se encuentra después de la proteína de fusión y antes de la proteína de interés. Las proteínas de interés se clonaron entre los sitios de restricción NcoI (azul) y XhoI (café).....	58
Figura 10. Amplificación de Miraculin en gel de agarosa al 0.7%. El carril 1 muestra el marcador de peso molecular, en el carril 2 se muestra un control negativo con enzima sin ADN molde, en el carril 3 el control negativo sin enzima con ADN molde y en el carril 4 se encuentra la amplificación de Miraculin (573 pb).....	59
Figura 11. Productos de la PCR para la confirmación de la construcción CusF3H+_Miraculin en gel de agarosa al 0.7%. Carril 1: marcador de peso molecular, Carriles 2-4: ADNs plasmídicos analizados, carril 5: control negativo con enzima sin ADN molde y carril 6: control negativo sin enzima con ADN molde.....	60
Figura 12. Productos de la PCR para la confirmación de la construcción SmbP_Brazzein (653 pb) en gel de agarosa al 0.7%. Carril 1: marcador de peso molecular, carriles 2 y 3: ADNs plasmídicos analizados.....	61
Figura 13. Expresiones en pequeña escala para CusF3H+_Brazzein (17.09 kDa) y CusF3H+_Miraculin (32.07 kDa) mediante SDS-PAGE al 15%. Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: fracción soluble <i>E. coli</i> SHuffle T7 express, carril 3: fracción insoluble <i>E. coli</i> SHuffle T7 express, carril 4: fracción soluble CusF3H+, carril 5 y 7: fracción soluble de CusF3H+_Brazzein, carril 6 y 8: fracción insoluble de CusF3H+_Brazzein, carril 9 y 11: fracción soluble CusF3H+_Miraculin y carril 10 y 12: fracción insoluble de CusF3H+_Miraculin.....	62
Figura 14. Cromatograma de purificación por afinidad a Ni(II) para CusF3H+_Brazzein. Solución amortiguadora de lisis y lavado: 50 mM Tris, 500 mM NaCl, solución amortiguadora de elución: 50 mM Tris, 500 mM NaCl, 200 mM imidazol pH 8. El pico de elución se obtuvo a los 69.658 mL de elución con una absorbancia de 728.343 mAu.	63

- Figura 15. Análisis de fracciones de elución de CusF3H+_Brazzein (17.09 kDa) mediante SDS-PAGE 15%. Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: lisado, carril 3: percolado, carril 4: lavado, carriles 5-15: fracciones de elución.....64
- Figura 16. Cromatograma de purificación por afinidad a Ni(II) para CusF3H+_Brazzein. Solución amortiguadora de lisis: 50 mM Tris, 500 mM NaCl, 5 mM imidazol, solución amortiguadora de lavado: 50mM Tris, 500mM NaCl, 10mM imidazol y solución amortiguadora de elución: 50 mM Tris, 500 mM NaCl, 200 mM imidazol pH 8. El pico de elución se obtuvo a los 70 mL de elución con una absorbancia de 1011.621 mAu.65
- Figura 17. Análisis de fracciones de elución de CusF3H+_Brazzein (17.09 kDa) mediante SDS-PAGE 15%. Carriles 1 y 16: marcador de peso molecular, carril 2: lisado, carril 3: percolado, carriles 4 y 5: lavados, carriles 6-26: fracciones de elución.66
- Figura 18. Cromatograma de purificación por Intercambio Aniónico con gradiente de elución para CusF3H+_Brazzein. Pico de elución 1: 76.294 mL, con concentración de 125 mM NaCl (12.5%) y absorbancia de 577.092 mAu. Pico de elución 2: 156.486 mL con concentración de 1 M NaCl (100%) y absorbancia de 85.511 mAu.67
- Figura 19. Análisis de fracciones de elución de CusF3H+_Brazzein (17.09 kDa) mediante SDS-PAGE 15%. Carriles 1, 18 y 34: marcador de peso molecular, carriles: 2-17, 19-33 y 35 fracciones de elución.68
- Figura 20. Curva de calibración de BSA para la cuantificación de CusF3H+_Brazzein69
- Figura 21. Análisis de digestión a 25°C con la enzima enteroquinasa para CusF3H+_Brazzein mediante SDS-PAGE 18%. Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: CusF3H+_Brazzein sin digerir, carril 3: 2 horas de digestión, carril 4: 4 horas de digestión, carril 5: 6 horas de digestión y carril 6: 24 horas de digestión.....70
- Figura 22. Expresiones en pequeña escala para SmbP_Brazzein (16.8 kDa) mediante SDS-PAGE al 15%. Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: fracción soluble *E. coli* SHuffle T7 express, carril 3: fracción insoluble *E. coli* SHuffle T7 express, carriles 4, 6 y 8: fracción soluble SmbP_Brazzein, carril 5, 7 y 9: fracción insoluble de SmbP_Brazzein.71
- Figura 23. Cromatograma de purificación por afinidad a Ni(II) para SmbP_Brazzein con gradiente de elución. Solución amortiguadora de lisis: 50 mM Tris, 500 mM NaCl, 5 mM imidazol, solución amortiguadora de lavado: 50mM Tris, 500mM NaCl, 10mM imidazol y solución amortiguadora de elución: 50 mM Tris, 500 mM NaCl, 200 mM imidazol pH 8. El pico de elución más alto se obtuvo a los 73.9 mL de elución con una absorbancia de 264.81.621 mAu.....72
- Figura 24. Análisis de fracciones de elución de SmbP_Brazzein (16.8 kDa) mediante SDS-PAGE 15%. Carriles 1 y 11: marcador de peso molecular, carril 2: lisado, carril 3: percolado, carriles 4: lavado 5-10 y 12-20: fracciones de elución73
- Figura 25. Cromatograma de purificación por exclusión por tamaño de SmbP y Brazzein después de digestión con enteroquinasa. El pico 3 eluyó a los 19.27 mL y el pico 4 a los 20.31 mL.74
- Figura 26. Análisis de fracciones de elución por exclusión por tamaño de SmbP (9.8 kDa) y Brazzein (6.37 kDa) mediante SDS-PAGE 16%. Carril 1: marcador de peso molecular,

- carril 2: SmbP_Brazzein después de digestión con enteroquinasa, carriles 3 y 4: fracciones de elución de SmbP y carriles 5-7: fracciones de elución de Brazzein.75
- Figura 27. Cromatograma de purificación por intercambio aniónico para SmbP + Brazzein después de digerir con enteroquinasa. Buffer de equilibrio: 50mM Tris, pH 8, y buffer de elución: 50mM Tris, 1M NaCl, pH 8. El pico de elución de brazzein se obtuvo a los 42.54 mL de elución con una absorbancia de 52.67 mAu y una concentración de 312 mM de NaCl (31.2%).76
- Figura 28. Análisis de fracciones de elución de la separación de SmbP (9.8 kDa) + Brazzein (6.37 kDa) por IA mediante SDS-PAGE 15%. Carriles 1 y 16: marcador de peso molecular, carril 2: Digestión de SmbP_Brazzein con enteroquinasa, carriles 12-20: fracciones de elución de Brazzein, carriles 23-30: fracciones de elución de SmbP.77
- Figura 29. Cromatograma de purificación por afinidad a Ni (II) para CusF3H+_MCL. Solución amortiguadora de lisis y lavado: 50 mM Tris, 500 mM NaCl, solución amortiguadora de elución: 50 mM Tris, 500 mM NaCl, 200 mM imidazol pH 8. El pico de elución se obtuvo a los 74.40 mL de elución con una absorbancia de 604.09 mAu78
- Figura 30. Análisis de fracciones de elución de CusF3H+_MCL (32.07 kDa) mediante SDS-PAGE 15%. Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: lisado, carril 3: percolado, carril 4: lavado, carriles 5-15: fracciones de elución.....79
- Figura 31. Análisis de fracciones del tratamiento con lisozima, lisozima/triton y lisis celular para CusF3H+_MCL (32.07 kDa) por SDS-PAGE 15%. Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: clarificado del tratamiento con lisozima, carril 3: residuo celular del tratamiento con lisozima, carril 4: clarificado del tratamiento con lisozima después de la lisis celular, carril 5: residuo celular del tratamiento con lisozima después de la lisis celular, carril 7: clarificado del tratamiento con lisozima y triton, carril 8: residuo celular del tratamiento con lisozima y triton, carril 9: clarificado del tratamiento con lisozima, lisis celular y triton, carril 10: residuo celular del tratamiento con lisozima, lisis celular y triton.80
- Figura 32. Análisis de fracciones del tratamiento con NaCl/Triton X-100 para CusF3H+_MCL (32.07 kDa) por SDS-PAGE 15%. Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: clarificado después de la lisis celular, carril 3: clarificado del tratamiento con 50 mM Tris, 1M NaCl, carril 4: residuo celular del tratamiento con 50 mM Tris, 1M NaCl, carril 5: clarificado del tratamiento con 50 mM Tris, 1M NaCl, 1% triton X-100, carril 6: residuo celular del tratamiento con 50 mM Tris, 1M NaCl, 1% triton X-100, carril 7: clarificado del tratamiento con 50 mM Tris, 1M NaCl, 1.8% triton X-100, carril 8: residuo celular del tratamiento con 50 mM Tris, 1M NaCl, 1.8% triton X-100, carril 9: clarificado del tratamiento con 50 mM Tris, 1M NaCl, 2.1% triton X-100, carril 10: residuo celular del tratamiento con 50 mM Tris, 1M NaCl, 2.1% triton X-100, carril 11: clarificado del tratamiento con 50 mM Tris, 1M NaCl, 2.1% triton X-100 por toda la noche, carril 12: residuo celular del tratamiento con 50 mM Tris, 1M NaCl, 2.1% triton X-100 por toda la noche.....81
- Figura 33. Análisis de fracciones del tratamiento por congelación/descongelación y detergentes iónicos a 4°C. Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: 0.1% CHAPS 1 hora, carril 3: 0.1% CHAPS 24 horas, carril 4: 0.3% sarcosil 1 hora, carril 5: 0.3% sarcosil 24 horas, carril 6: 1 mM BME 1 hora, carril 7: 1mM BME 24 horas, carril 8: 0.1%

- CHAPS + 0.3% sarcosil 1 hora, carril 9: 0.1% CHAPS + 0.3% sarcosil 24 horas, carril 10: 0.1% CHAPS + 1 mM BME 1 hora, carril 11: 0.1% CHAPS + 1 mM BME 24 horas, carril 12: 0.3% sarcosil + 1 mM BME 1 hora, carril 13: 0.3 sarcosil + 1 mM BME 24 horas, carril 14: 0.1% CHAPS + 0.3% sarcosil + 1 mM BME 1 hora, carril 15: 0.1% CHAPS + 0.3% sarcosil + 1 mM BME 24 horas.....83
- Figura 34. Purificación de CusF3H+_MCL (32.07 kDa) expresada en Origami2(DE3) mediante SDS-PAGE al 12%. Carril 1: Marcador de peso molecular, carril 2: Clarificado, carril 3: Restos celulares después de lisis con perlas de vidrio y lisozima, carril 4: percolado, carril 5: fracción de lavado, carril 6-10: fracciones de elución de CusF3H+_MCL.....84
- Figura 35. Análisis de microexpresión de SmbP_MCL(31.72 kDa) y CusF3H+_MCL (32.07 kDa) en medio Native Folder mediante SDS-PAGE 15%. Carril 2: marcador de peso molecular, carril 3: SmbP_MCL antes de la inducción con calentamiento a 95°C, carril 4: SmbP_MCL después de la inducción con calentamiento a 95°C, carril 5: CusF3H+_MCL antes de la inducción con calentamiento a 95°C, carril 6: CusF3H+_MCL después de la inducción con calentamiento a 95°C, carril 8: SmbP_MCL después de la inducción por lisis con perlas de vidrio, carril 9: CusF3H+_MCL después de la inducción por lisis con perlas de vidrio.85
- Figura 36. Cromatograma de purificación por afinidad a Ni(II) para SmbP_MCL expresada en Native Folder. Solución amortiguadora de lisis y lavado: 50 mM Tris, 500 mM NaCl, 5 mM imidazol, pH 8 y solución amortiguadora de elución: 50 mM Tris, 500 mM NaCl, 200 mM imidazol, pH 8. El pico de elución se obtuvo a los 59.28 mL de elución con una absorbancia de 191.73 mAu.86
- Figura 37. Análisis de fracciones de elución de SmbP_MCL (31.72 kDa) expresada en Native Folder mediante SDS-PAGE 15%. Carriles 1 y 11: marcador de peso molecular, carril 2: lisado, carril 3: percolado, carril 4: lavado, carriles 5-10 y 12-20: fracciones de elución.87
- Figura 38. Cromatograma de purificación por intercambio aniónico para SmbP + MCL después de digerir con enteroquinasa. Buffer de equilibrio: 50mM Tris, pH 8, y buffer de elución: 50mM Tris, 1M NaCl, pH 8. El pico 1 se obtuvo a los 45.18 mL de elución con una absorbancia de 54.38 mAu y una concentración de 256 mM de NaCl (25.6%). El pico 2 se obtuvo a los 47.38 mL de elución con una absorbancia de 64.22 mAu y una concentración de 311 mM de NaCl (31.1%). El pico 3 se obtuvo a los 48.64 mL de elución con una absorbancia de 77.64 mAu y una concentración de 343 mM de NaCl (34.3%). El pico 4 se obtuvo a los 51.04 mL de elución con una absorbancia de 73.81 mAu y una concentración de 403 mM de NaCl (40.3%).88
- Figura 39. Análisis de fracciones de elución de la separación de SmbP (9.8 kDa) + MCL (21.35 kDa) por IA mediante SDS-PAGE 15%. Carriles 1 y 16: marcador de peso molecular, carril 2: SmbP_MCL sin digerir, carril 3: Digestión de SmbP_MCL con enteroquinasa, carriles 12-15: fracciones de elución de MCL, carriles 17-25: fracciones de elución de MCL + SmbP y carriles 26-30: fracciones de elución de SmbP_MCL.....89
- Figura 40. Microexpresión a diferentes condiciones de PelB_SmbP_Scygonadin (21.1 kDa), CusF3H+_Scygonadin (21.4 kDa) y SmbP_Scygonadin (21.1 kDa). Carril 1: F- Hiper. *E. coli* BL21(DE3), carril 2: F. hipo *E. coli* BL21(DE3), carril 3: F. Hiper PelB_SmbP_Scygonadin, carril 4: F. Hipo. PelB_SmbP_Scygonadin, carril 5: marcador

- de peso molecular, carril 6: control negativo *E. coli* Shuffle T7 express a 17 °C /16 horas/0.1 mM IPTG, carril 7: CusF3H+_Scygonadin, carril 8: SmbP_Scygonadin, carril 9: control negativo *E. coli* Shuffle T7 express a 37 °C /16 horas/0.1 mM IPTG, carril 10: CusF3H+_Scygonadin y carril 11: SmbP_Scygonadin.91
- Figura 41. Análisis de fracciones de purificación IMAC de CusF3H+_Scygonadin (21.4 kDa) por SDS-PAGE 12%. Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: lisado/clarificado, carril 3: percolado/fracción no unida, carriles 4 – 7: fracciones de lavado con 50 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 8.05, carriles 8 – 15: fracciones de elución de CusF3H+_Scygonadin.93
- Figura 42. Análisis de fracciones de purificación IMAC de SmbP_Scygonadin (21.1 kDa) por SDS-PAGE 12%. Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: lisado/clarificado, carril 3: percolado/fracción no unida, carriles 4 y 5: fracciones de lavado con 50 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 8.05, carriles 6 – 15: fracciones de elución de SmbP_Scygonadin.94
- Figura 43. Reacción con enteroquinasa (EK) para la remoción del tag de CusF3H+_Scygonadin (21.4). Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: CusF3H+_Scygonadin (21.4 kDa) sin digerir, carril 3: CusF3H+ (10.15 kDa) + Scygonadin (11.27 kDa) después de la digestión con enteroquinasa, carril 4: percolado/fracción no unida, carriles 5 – 7: fracciones de lavado, carriles 8 – 10: fracciones de elución.95
- Figura 44. Reacción con enteroquinasa (EK) para la remoción del tag de SmbP_Scygonadin (21.1 kDa). Carril 1: SmbP_Scygonadin (21.1 kDa) sin digerir, carril 2: SmbP (9.8 kDa) + Scygonadin (11.27 kDa) después de la digestión con enteroquinasa, carril 3: marcador de peso molecular, carril 4: percolado/fracción no unida, carriles 5 – 7: fracciones de lavado, carriles 8 – 10: fracciones de elución.96
- Figura 45. Análisis de restricción con NcoI y XhoI para la confirmación de las construcciones en tándem con CusF3H+ en gel de agarosa al 0.7%. Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: CusF3H+_Brazzein3xNG (495 pb), carril 3: CusF3H+_Rattusin2xNG (198 pb) y carril 4: CusF3H+_Rattusin3xNG (297 pb).100
- Figura 46. Productos de PCR para la confirmación de las construcciones en tándem con SmbP en gel de agarosa al 0.7%. Carril 1: marcador de peso molecular, carriles 2, 3 y 4: SmbP_Brazzein3xNG (989 pb), carriles 5, 6 y 7: SmbP_Rattusin3xNG (791 pb), carriles 8,9 y 10: SmbP_Rattusin2xNG (692 pb).101
- Figura 47. Microexpresión en *E. coli* SHuffle de tandems con CusF3H+ por SDS-PAGE 15%. Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: control negativo de *E. coli* SHuffle, carril 3: control positivo de CusF3H+_STOP (10.15), carril 4: CusF3H+_Brazzein3xNG (30.31 kDa), carril 5: CusF3H+_Rattusin2xNG (18.34 kDa), carril 6: CusF3H+_Rattusin3xNG (22.14 kDa).102
- Figura 48. Análisis de expresión de los tándems SmbP_Brazzein3xNG (30.02 kDa), SmbP_Rattusin 2xNG (18.05 kDa) y SmbP_Rattusin3xNG (21.86 kDa) en *E. coli* SHuffle por SDS-PAGE 15%. Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: control negativo *E. coli* SHuffle, carriles 3, 4, 5 y 6: SmbP_Brazzein3xNG, carriles 7, 8 9 y 10: SmbP_Rattusin2xNG, carriles 11, 12, 13 y 14: SmbP_Rattusin3xNG.103
- Figura 49. Análisis de expresión de los tándems SmbP_Brazzein3xNG (30.02 kDa), SmbP_Rattusin2xNG (18.05 kDa) y SmbP_Rattusin3xNG (21.86 kDa) en *E. coli* Origami2(DE3) por SDS-PAGE 15%. Carril 2: marcador de peso molecular, carril 3:

- control positivo SmbP_STOP (9.8 kDa), carriles 4, 5, 6 y 7: SmbP_Brazzein3xNG, carriles: 8, 9, 10 y 11: SmbP_Rattusin2xNG, carriles 12, 13, 14 y 15: SmbP_Rattusin3xNG.105
- Figura 50. Cromatograma de purificación por afinidad a Ni(II) para SmbP_Brazzein_NG3X con gradiente de elución. Solución amortiguadora de lisis: 50 mM Tris, 500 mM NaCl, 5 mM imidazol, solución amortiguadora de lavado: 50mM Tris, 500mM NaCl, 10mM imidazol y solución amortiguadora de elución: 50 mM Tris, 500 mM NaCl, 200 mM imidazol pH 8. El pico de elución más alto se obtuvo a los 77.7 mL de elución con una absorbancia de 132.09 mAu.106
- Figura 51. Análisis de fracciones de elución de SmbP_Brazzein3xNG (30.02 kDa) mediante SDS-PAGE 15%. Carriles 1 y 17: marcador de peso molecular, carril 2: clarificado, carril 3: percolado, carril 4: lavado, carriles 5-16 y 18-30: fracciones de elución.107
- Figura 52. Análisis de digestión con hidroxilamina a 1M y 2M para SmbP_Brazzein3xNG (30.02 kDa) mediante Tricina-SDS-PAGE 15%. Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: SmbP_Brazzein3xNG sin digerir, carriles 3-8: digestión con 1 M NH₂OH a 1, 2, 3, 4, 17 y 20 horas de reacción, carriles 9-14: digestión con 1 M NH₂OH a 1, 2, 3, 4, 17 y 20 horas de reacción.108
- Figura 53. Cromatograma de purificación por intercambio aniónico para SmbP + Brazzein3xNG después de digerir con enteroquinasa. Buffer de equilibrio: 50mM Tris, pH 8, y buffer de elución: 50mM Tris, 1M NaCl, pH 8. El pico 1 se obtuvo a los 43.89 mL de elución con una absorbancia de 67.94 mAu y una concentración de 224 mM de NaCl (22.4%). El pico 2 se obtuvo a los 45.23 mL de elución con una absorbancia de 56.97 mAu y una concentración de 258 mM de NaCl (25.8%). El pico 3 se obtuvo a los 49.24 mL de elución con una absorbancia de 115.34 mAu y una concentración de 358 mM de NaCl (35.8%).109
- Figura 54. Análisis de fracciones de elución de la separación de SmbP (9.8 kDa) + brazzein3xNG (19.58 kDa) por IA mediante SDS-PAGE 15%. Carriles 1 y 17: marcador de peso molecular, carriles 2-15: fracciones de elución de brazzein3xNG, carriles 18-26: fracciones de elución de brazzein3xNG + SmbP + quimera, carril 27: SmbP_Brazzein3xNG sin digerir, carriles 28, 29 y 30: digestión de SmbP_Brazzein3xNG con enteroquinasa a las 16, 20 y 22 horas de reacción respectivamente.110
- Figura 55. Microexpresión a diferentes condiciones de PelB_SmbP_Brazzein FLEX (31.4 kDa), CusF3H+_Brazzein FLEX (31.68 kDa) y SmbP_Brazzein FLEX (31.4 kDa). Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: control negativo *E. coli* SHuffle a 17 °C /16 horas/0.1 mM IPTG, carril 3: CusF3H+_Brazzein FLEX, carril 4: SmbP_Brazzein FLEX, carril 5: control negativo *E. coli* SHuffle a 37 °C /16 horas/0.1 mM IPTG, carril 6: CusF3H+_Brazzein FLEX, carril 7: SmbP_Brazzein FLEX, carril 11: marcador de peso molecular, carril 12: F. Hiper. *E. coli* BL21(DE3), carril 13: F. Hipo *E. coli* BL21(DE3), carril 14: F. Hiper PelB_SmbP_Scygonadin FLEX, carril 15: F. Hipo PelB_SmbP_Brazzein FLEX.115
- Figura 56. Microexpresión a diferentes condiciones de PelB_SmbP_Scygonadin FLEX (33.9 kDa), CusF3H+_Scygonadin FLEX (34.19 kDa) y SmbP_Scygonadin FLEX (33.9 kDa). Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: control negativo *E. coli* SHuffle a 17 °C /16 horas/0.1 mM IPTG, carril 3: CusF3H+_Scygonadin FLEX, carril 4: SmbP_Scygonadin

- FLEX, carril 5: control negativo *E. coli* SHuffle a 37 °C /16 horas/0.1 mM IPTG, carril 6: CusF3H+_Scygonadin FLEX, carril 7: SmbP_Scygonadin FLEX, carril 8: F. Hiper. *E. coli* BL21(DE3), carril 9: F. Hipo *E. coli* BL21(DE3), carril 10: F. Hiper PelB_SmbP_Scygonadin FLEX, carril 11: F. Hipo PelB_SmbP_Scygonadin FLEX.....117
- Figura 57. Microexpresión a diferentes condiciones de PelB_SmbP_Hepcidin FLEX (20.68 kDa), CusF3H+_Hepcidin FLEX (20.97 kDa) y SmbP_Hepcidin FLEX (20.68 kDa). Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: control negativo *E. coli* SHuffle a 17 °C /16 horas/0.1 mM IPTG, carril 3: CusF3H+_Hepcidin FLEX, carril 4: SmbP_Hepcidin FLEX, carril 5: control negativo *E. coli* SHuffle a 37 °C /16 horas/0.1 mM IPTG, carril 6: CusF3H+_Hepcidin FLEX, carril 7: SmbP_Hepcidin FLEX, carril 8: marcador de peso molecular, carril 9: F. Hiper. *E. coli* BL21(DE3), carril 10: F. Hipo *E. coli* BL21(DE3), carril 11: F. Hiper PelB_SmbP_Hepcidin FLEX, carril 12: F. Hipo PelB_SmbP_Hepcidin FLEX.119
- Figura 58. Análisis de fracciones de purificación IMAC de CusF3H+_Brazzein FLEX (31.68 kDa) por SDS-PAGE 12%. Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: lisado/clarificado, carril 3: percolado/fracción no unida, carriles 4 – 5: fracciones de lavado con 50 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 8.05, carriles 6 – 15: fracciones de elución de CusF3H+_Brazzein FLEX.120
- Figura 59. Análisis de fracciones de purificación IMAC de SmbP_Brazzein FLEX (31.4 kDa) por SDS-PAGE 12%. Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: lisado/clarificado, carril 3: percolado/fracción no unida, carriles 4 y 5: fracciones de lavado con 50 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 8.05, carriles 6 – 15: fracciones de elución de SmbP_Brazzein FLEX.....121
- Figura 60. Análisis de fracciones de purificación IMAC de CusF3H+_Hepcidin FLEX (20.97 kDa) por SDS-PAGE 12%. Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: lisado/clarificado, carril 3: percolado/fracción no unida, carriles 4 – 7: fracciones de lavado con 50 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 8.05, carriles 8 – 15: fracciones de elución de CusF3H+_Hepcidin FLEX.....121
- Figura 61. Análisis de fracciones de purificación IMAC de SmbP_Hepcidin FLEX (20.68 kDa) por SDS-PAGE 12%. Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: lisado/clarificado, carril 3: percolado/fracción no unida, carriles 4 y 5: fracciones de lavado con 50 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 8.05, carriles 6 – 15: fracciones de elución de SmbP_Hepcidin FLEX.....122
- Figura 62. Análisis de fracciones de purificación IMAC de CusF3H+_Scygonadin FLEX (34.19 kDa) por SDS-PAGE 12%. Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: lisado/clarificado, carril 3: percolado/fracción no unida, carriles 4 – 7: fracciones de lavado con 50 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 8.05, carriles 8 – 15: fracciones de elución de CusF3H+_Scygonadin FLEX.123
- Figura 63. Análisis de fracciones de purificación IMAC de SmbP_Scygonadin FLEX (33.9 kDa) por SDS-PAGE 12%. Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: lisado/clarificado, carril 3: percolado/fracción no unida, carriles 4 y 5: fracciones de lavado con 50 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 8.05, carriles 6 – 15: fracciones de elución de SmbP_Scygonadin FLEX.....124

- Figura 65. Reacción con enteroquinasa (EK) para la remoción del tag de CusF3H+_Brazzein FLEX (31.68 kDa). Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: CusF3H+_Brazzein FLEX (31.68 kDa) sin digerir, carril 3: CusF3H+ (10.15 kDa) + Brazzein FLEX (20.96 kDa) después de la digestión con enteroquinasa, carril 4: percolado/fracción no unida, carriles 5 – 7: fracciones de lavado, carriles 8 – 10: fracciones de elución.....126
- Figura 66. Reacción con enteroquinasa (EK) para la remoción del tag de SmbP_Brazzein FLEX (31.4 kDa). Carril 1: SmbP_Brazzein FLEX (31.4 kDa) sin digerir, carril 2: SmbP (9.8 kDa) + Brazzein FLEX (20.96 kDa) después de la digestión con enteroquinasa, carril 3: marcador de peso molecular, carril 4: percolado/fracción no unida, carriles 5 – 7: fracciones de lavado, carriles 8 – 10: fracciones de elución.127
- Figura 67. Reacción con enteroquinasa (EK) para la remoción del tag de SmbP_Hepcidin FLEX (20.68 kDa). Carril 1: SmbP_Hepcidin FLEX (20.68 kDa) sin digerir, carril 2: SmbP (9.8 kDa) + Hepcidin FLEX (10.24 kDa) después de la digestión con enteroquinasa, carril 3: marcador de peso molecular, carril 4: percolado/fracción no unida, carriles 5 – 7: fracciones de lavado, carriles 8 – 10: fracciones de elución.128
- Figura 68. Reacción con enteroquinasa (EK) para la remoción del tag de CusF3H+_Scygonadin FLEX (34.19). Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: CusF3H+_Brazzein FLEX (34.19 kDa) sin digerir, carril 3: CusF3H+ (10.15 kDa) + Scygonadin FLEX (23.47 kDa) después de la digestión con enteroquinasa, carril 4: percolado/fracción no unida, carriles 5 – 7: fracciones de lavado, carriles 8 – 10: fracciones de elución.129
- Figura 69. Reacción con enteroquinasa (EK) para la remoción del tag de SmbP_Scygonadin FLEX (33.9 kDa). Carril 1: SmbP_Scygonadin (33.9 kDa) sin digerir, carril 2: SmbP (9.8 kDa) + Scygonadin (23.47 kDa) después de la digestión con enteroquinasa, carril 3: marcador de peso molecular, carril 4: percolado/fracción no unida, carriles 5 – 7: fracciones de lavado, carriles 8 – 10: fracciones de elución.130

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Enlaces disulfuro

Uno de los problemas más comunes en la producción de proteínas recombinantes incluye el mal plegamiento de estas, sobre todo en aquellas que contienen residuos de cisteína y forman puentes disulfuro [1]. Los enlaces disulfuro son una de las modificaciones post-traduccionales más comunes en proteínas. Éstos se forman mediante la oxidación de grupos sulfhidrilo entre dos cadenas laterales de cisteína dando como resultado un enlace covalente, aumentando considerablemente la estabilidad de una proteína [2].

Alrededor de un tercio de todas las proteínas humanas se pliegan en el retículo endoplásmico (ER) y es ahí donde adquieren los puentes disulfuro [3]. En bacterias, la formación de estos enlaces se lleva a cabo en el periplasma, esto debido a que el espacio periplásmico es un compartimento oxidante que almacena las enzimas encargadas de la formación del enlace disulfuro y de su isomerización, así como chaperonas y enzimas de plegamiento [4]. Sin embargo, el periplasma de *Escherichia coli* no está adaptado para producir altos rendimientos de proteínas con múltiples enlaces disulfuro [5].

En bacterias, el citoplasma es el espacio celular en donde se sintetizan las proteínas, no obstante, carece de los componentes que catalizan la formación de los enlaces disulfuro. Además, cuenta con sistemas activos que resultan en la reducción de enlaces disulfuro, como lo son las vías de la enzima glutatión reductasa y tiorredoxina reductasa

[6]. Debido a la presencia de estas vías, se cree que la producción de proteínas que contienen enlaces disulfuro es imposible en el citoplasma de la mayoría de los procariontes de tipo silvestre como *E. coli*. Cuando se expresan tales proteínas son incapaces de alcanzar su conformación nativa y comúnmente forman agregados insolubles conocidos como cuerpos de inclusión. Aunque tales cuerpos de inclusión pueden ser purificados y replegados, sería útil tener un sistema para la producción a gran escala de proteínas que contienen enlaces disulfuro en el citoplasma de *E. coli* [6].

En *E. coli* la formación de enlaces disulfuro en el periplasma es catalizada por la enzima DsbA, la cual es una oxidasa que detecta y oxida los residuos de cisteína al entrar al periplasma (Figura 1). Sin embargo, aquellas proteínas con enlaces disulfuro no consecutivos requieren de la presencia de la enzima disulfuro isomerasa para corregir el acomodo de los enlaces disulfuro dentro de la proteína que no ha sido plegada correctamente. En *E. coli*, dicha disulfuro isomerasa se conoce como DsbC [5].

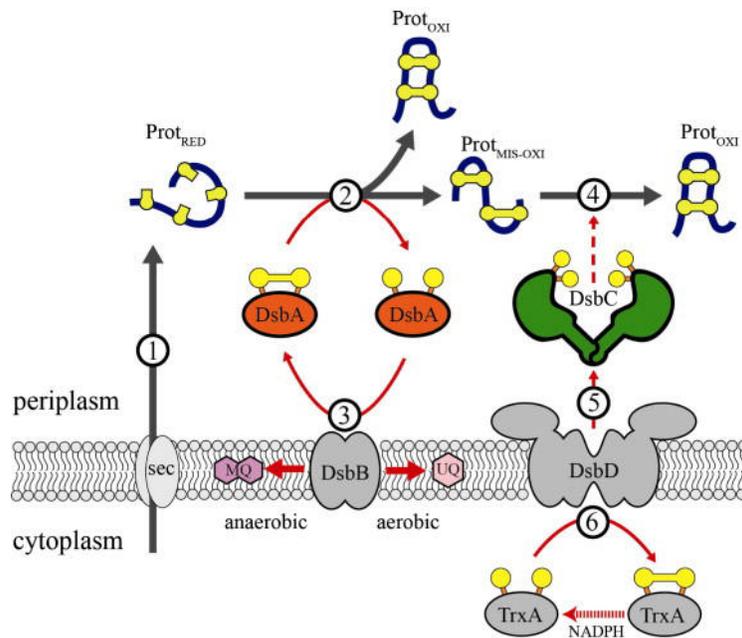


Figura 1. Formación de enlaces disulfuro en el periplasma de *Escherichia coli*. Berkmen (2012)

Para eludir el problema asociado con la producción de formación de enlaces disulfuro en el citoplasma de *E. coli* una variedad de cepas modificadas han sido producidas. Estas cepas que evolucionaron a partir de estudios sobre la fisiología de *E. coli* tienen una interrupción total o parcial de una o ambas vías implicadas en asegurar que el citoplasma sea un ambiente reductor y además cuentan con la enzima disulfuro isomerasa DsbC que se encarga de la formación y el correcto plegamiento de los enlaces disulfuro [5]. Un ejemplo de este tipo de cepas modificadas es el sistema SHuffle de New England Biolabs [5].

Aunque los sistemas de expresión eucariotas tales como las células de ovario de hámster chino (CHO), levaduras, hongos, plantas o insectos ofrecen la capacidad de expresar proteínas complejas unidas a múltiples enlaces disulfuro, estos sistemas son lentos y costosos. Para la mayoría de las aplicaciones, la expresión procariótica sigue siendo el sistema de expresión más atractivo debido a su costo relativamente bajo, alta velocidad, facilidad de uso, altos rendimientos y la disponibilidad de un gran número de herramientas genéticas con fines de optimización, por lo tanto, *Escherichia coli* es la opción más popular para la producción de proteínas recombinantes [5].

Una vez resuelto el problema de cómo se puede lograr la expresión y el correcto plegamiento de proteínas recombinantes con enlaces disulfuro en el citoplasma de *E. coli*, la purificación de estas proteínas recombinantes pudiera ser difícil, es por eso que se buscan nuevas opciones para mejorar la solubilidad y la eficiencia en la purificación; es aquí dónde surgen las proteínas de fusión.

1.2 Proteínas de fusión

Las proteínas de fusión son péptidos cortos, dominios de proteínas o proteínas enteras que se fusionan a nivel genético para que las proteínas exógenas producidas por la célula tengan las propiedades bioquímicas de la etiqueta de fusión añadida. Las

proteínas de fusión por lo regular tienen la capacidad de unirse a un ligando específico sirviendo como etiquetas de afinidad que permiten una purificación rápida de proteínas recombinantes por medio de cromatografía por afinidad. Ya han sido reportadas diferentes proteínas de fusión como la proteína de unión a la maltosa (MBP), la glutatión S-transferasa (GST) y tiorredoxina (Trx). Sin embargo, dado que estas proteínas de fusión no son universalmente aplicables, es importante continuar buscando alternativas que puedan servir para optimizar la producción de proteínas de interés [7].

CusF (Figura 2) es una proteína periplásmica que forma parte del complejo CusCBFA y que juega un papel importante en la resistencia de *E. coli* ante la presencia de altos niveles de cobre y plata. CusF es una proteína pequeña de aproximadamente 9.9 kDa y forma una estructura de barril [7].



Figura 2. Estructura secundaria de CusF. PDBE (2018)

CusF ha demostrado características importantes que le permiten actuar como una proteína de fusión, por ejemplo: su alta solubilidad, su bajo peso molecular y su capacidad de unión a Cu(II). Sin embargo, una de las desventajas de CusF al purificar por medio de IMAC con Cu(II) es la presencia de más impurezas [8]. Tomando en cuenta lo anterior, CusF ha sido modificada mediante la adición de tres histidinas en el extremo N-terminal con el objetivo de utilizar su capacidad de unión a Ni(II) en vez de Cu(II), facilitar la remoción de esta etiqueta de afinidad, aumentar la solubilidad y el rendimiento final. Dicha proteína ha recibido el nombre de CusF3H+ [8]. En la Tabla 1 se

puede apreciar la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos que codifican para esta proteína de fusión.

Tabla 1. Secuencia de nucleótidos y aminoácidos que codifican para la proteína de fusión CusF3H+

Secuencia de nucleótidos y aminoácidos que codifican para la proteína de fusión CusF3H+															
ATG	CAC	CAC	CAC	CAT	CAT	CAT	GAA	ACC	ATG	AGC	GAA	GCA	CAA	CCA	
M	H	H	H	H	H	H	E	T	M	S	E	A	Q	P	15
CAG	GTT	ATT	AGC	GCC	ACT	GGC	GTG	GTA	AAG	GGT	ATC	GAT	CTG	GAA	
Q	V	I	S	A	T	G	V	V	K	G	I	D	L	E	30
AGC	AAA	AAA	ATC	ACC	ATC	CAT	CAC	GAT	CCG	ATT	GCT	GCC	GTG	AAC	
S	K	K	I	T	I	H	H	D	P	I	A	A	V	N	45
TGG	CCG	GAG	ATG	ACC	ATG	CGC	TTT	ACC	ATC	ACC	CCG	CAG	ACG	AAA	
W	P	E	M	T	M	R	F	T	I	T	P	Q	T	K	60
ATG	AGT	GAA	ATT	AAA	ACC	GGC	GAC	AAA	GTG	GCG	TTT	AAT	TTT	GTC	
M	S	E	I	K	T	G	D	K	V	A	F	N	F	V	75
CAG	CAG	GGC	AAC	CTT	TCT	TTA	TTA	CAG	GAT	ATT	AAA	GTC	AGC	CAG	
Q	Q	G	N	L	S	L	L	Q	D	I	K	V	S	Q	90

SmbP (Small metal-binding protein) es una proteína periplásmica de la bacteria *Nitrosomonas europaea*; es un monómero de 93 aminoácidos con un peso de 9.9 kDa [9]. SmbP ha sido considerada como una proteína de fusión ya que posee la capacidad de unirse a diferentes iones divalentes como el Ni, Cu y Zn. Además, al igual que CusF y CusF3H+ presenta una alta solubilidad y su peso molecular pequeño le permite obtener altos rendimientos una vez que ha sido removida [10]. En la Tabla 2 se pueden observar las secuencias de nucleótidos y aminoácidos que la conforman y en la Figura 3 se puede observar su estructura.

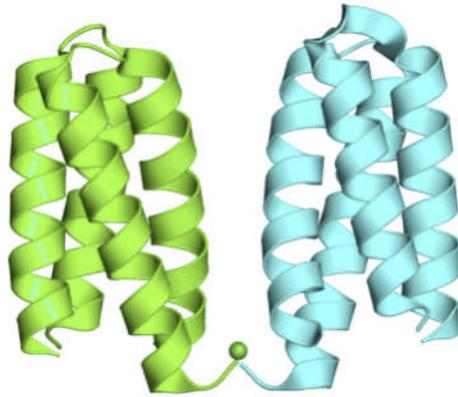


Figura 3. Estructura secundaria de SmbP. PDBE (2020)

Tabla 2. Secuencia de nucleótidos y aminoácidos que codifican para la proteína de fusión SmbP

Secuencia de nucleótidos y aminoácidos que codifican para la proteína de fusión SmbP															
ATG	AGC	GGC	CAC	ACC	GCG	CAC	GTG	GAC	GAG	GCG	GTT	AAG	CAC	GCG	
M	S	G	H	T	A	H	V	D	E	A	V	K	H	A	15
GAG	GAA	GCG	GTT	GCG	CAC	GGT	AAA	GAA	GGC	CAC	ACC	GAT	CAG	CTG	
E	E	A	V	A	H	G	K	E	G	H	T	D	Q	L	30
CTG	GAG	CAC	GCG	AAG	GAA	AGC	CTG	ACC	CAT	GCG	AAA	GCG	GCG	AGC	
L	E	H	A	K	E	S	L	T	H	A	K	A	A	S	45
GAA	GCG	GGT	GGC	AAC	ACC	CAT	GTG	GGT	CAC	GGC	ATC	AAG	CAC	CTG	
E	A	G	G	N	T	H	V	G	H	G	I	K	H	L	60
GAA	GAT	GCG	ATT	AAA	CAC	GGC	GAG	GAA	GGC	CAC	GTG	GGT	GTT	GCG	
E	D	A	I	K	H	G	E	E	G	H	V	G	V	A	75
ACC	AAG	CAC	GCG	CAA	GAG	GCG	ATC	GAA	CAC	CTG	CGT	GCG	AGC	GAG	
T	K	H	A	Q	E	A	I	E	H	L	R	A	S	E	90
CAC	AAA	AGC	CAC												
H	K	S	H												94

Así mismo SmbP posee una secuencia señal o péptido señal en su extremo N-terminal conocido como PelB [11]. PelB permite la exportación de las proteínas del citoplasma al periplasma por medio de la vía Sec lo que permite las proteínas terminen su plegamiento en este compartimento [11]. Tomando en cuenta lo anterior se ha utilizado la proteína de fusión SmbP junto con su péptido señal PelB (PelB_SmbP) en

aquellas proteínas que requieren modificaciones post-traduccionales como los puentes disulfuro [12]. La Tabla 3 muestra la secuencia de nucleótidos y aminoácidos que codifican para PelB_SmbP. En negritas se resaltan los aminoácidos que comprenden al péptido señal PelB.

Tabla 3. Secuencia de nucleótidos y aminoácidos que codifican para la proteína de fusión SmbP con el péptido señal PelB (PelB_SmbP)

Secuencia de nucleótidos y aminoácidos que codifican para la proteína de fusión SmbP con el péptido señal PelB (PelB_SmbP)														
ATG	AAA	TAC	CTG	CTG	CCG	ACC	GCT	GCT	GCT	GGT	CTG	CTG	CTG	CTG
M	K	Y	L	L	P	T	A	A	A	G	L	L	L	L
15														
GCT	GCT	CAG	CCG	GCT	ATG	GCT	AGC	GGC	CAC	ACC	GCG	CAC	GTG	GAC
A	A	Q	P	A	M	A	S	G	H	T	A	H	V	D
30														
GAG	GCG	GTT	AAG	CAC	GCG	GAG	GAA	GCG	GTT	GCG	CAC	GGT	AAA	GAA
E	A	V	K	H	A	E	E	A	V	A	H	G	K	E
45														
GGC	CAC	ACC	GAT	CAG	CTG	CTG	GAG	CAC	GCG	AAG	GAA	AGC	CTG	ACC
G	H	T	D	Q	L	L	E	H	A	K	E	S	L	T
60														
CAT	GCG	AAA	GCG	GCG	AGC	GAA	GCG	GGT	GGC	AAC	ACC	CAT	GTG	GGT
H	A	K	A	A	S	E	A	G	G	N	T	H	V	G
75														
CAC	GGC	ATC	AAG	CAC	CTG	GAA	GAT	GCG	ATT	AAA	CAC	GGC	GAG	GAA
H	G	I	K	H	L	E	D	A	I	K	H	G	E	E
90														
GGC	CAC	GTG	GGT	GTT	GCG	ACC	AAG	CAC	GCG	CAA	GAG	GCG	ATC	GAA
G	H	V	G	V	A	T	K	H	A	Q	E	A	I	E
105														
CAC	CTG	CGT	GCG	AGC	GAG	CAC	AAA	AGC	CAC					
H	L	R	A	S	E	H	K	S	H					
115														

1.3 Proteínas con enlaces disulfuro

1.3.1 Proteínas dulces y modificadoras del sabor

Existen estructuras proteicas con múltiples enlaces disulfuro en su estructura, las cuales han sido identificadas en frutas que crecen en África y Asia del sur y son conocidas como proteínas dulces y modificadoras del sabor [13]. Estas proteínas dulces tienen potencial para ser utilizadas como sustitutos de azúcar con poco aporte calórico y por lo tanto pueden ser utilizadas en alimentos, bebidas y medicinas [14]. Hasta la fecha,

solo se han descubierto ocho proteínas que se sabe que provocan dulzura al paladar, entre las que se incluye a: Taumatococcus, Brazzein, Curculin/Neoculin, Lisozima de la clara de huevo, Mabilin, Miraculin, Monelin y Pentadin. De entre todas estas, Brazzein, es la proteína más atractiva como sustituto de azúcar gracias a su sabor, buena estabilidad a altas temperaturas y amplios rangos de pH [15].

Brazzein es una proteína dulce de 6.5 kDa, es la más pequeña de todas las proteínas dulces y ha sido aislada en dos formas del fruto de la planta africana *Pentadiplandra brazzeana* Baillon, una planta que crece en África Occidental. Esta proteína presenta dos formas, la forma mayor contiene un ácido piroglutámico (pGlu) en su extremo N-terminal, consta de 54 aminoácidos y es de 500-2000 veces más dulce que la sacarosa. Por otra parte, la forma menor carece del ácido piroglutámico (pGlu) en el extremo N-terminal, consta de 53 aminoácidos y es el doble de veces más dulce que la forma mayor [16]. La estructura de Brazzein consta de 3 láminas β antiparalelas y una pequeña α hélice (Figura 3) y de acuerdo con la base de datos UNIPROT (P56552) Brazzein presenta 4 enlaces disulfuro entre los aminoácidos Cys3-Cys51, Cys15-Cys36, Cys21-Cys46 y Cys25-Cys48 [17].



Figura 4. Estructura secundaria de Brazzein. PDBE (2018).

Miraculin (Figura 4) es una proteína modificadora del sabor que se produce en los frutos de arbustos nativos de África Occidental como *Synsepalum dulcificu* y *Richadella dulcifica*. Miraculin (MCL) tiene la capacidad de modificar el sabor ácido al dulce, incluso

cuando la proteína por sí sola no tiene sabor [18]. Es un homodímero de 24.6 kDa, al que se le atribuye la actividad modificadora del sabor, y su secuencia consta de 191 aminoácidos con 2 sitios de N-glicosilación [19]. La glicosilación se presenta en Miraculin expresada en plantas de lechuga y tomate y en organismos como *Aspergillus oryzae*, sin embargo, no es esencial para la propiedad modificadora del sabor [20]. La dulzura máxima inducida por el ácido cítrico después de haber probado una solución de Miraculin es estimada de 3000 veces más dulce que la sacarosa [19]. De acuerdo con la base de datos UNIPROT (P13087) Miraculin presenta 3 enlaces disulfuro entre los aminoácidos Cys47-Cys92, Cys148-Cys159 y Cys152-Cys155.



Figura 5. Estructura secundaria de Miraculin. PDBE (2018)

1.3.2 Péptidos antimicrobianos

Por otra parte, existen otro tipo de proteínas con múltiples enlaces disulfuro las cuales son conocidas como péptidos antimicrobianos (AMP), los cuales son péptidos pequeños de entre 6-60 aminoácidos, aproximadamente el 50% son hidrófobos, y tienen una carga neta positiva debido a un exceso de residuos básicos. Estos pueden ser clasificados de acuerdo de la fuente de donde se extraen, por ejemplo: bacterias, arqueas, hongos, plantas y animales. Sin embargo, pueden ser clasificadas con base en

sus estructuras secundarias, en las que se incluyen α -hélices, hojas β , estructuras extendidas y estructuras de bucle [21].

Los péptidos antimicrobianos tienen dos propiedades atractivas. En primer lugar, demuestran una amplia gama de actividades antimicrobianas. En segundo lugar, se dirigen principalmente a las membranas microbianas, impidiendo la capacidad de los microorganismos para desarrollar resistencia contra ellos. Como resultado, se piensa que estos péptidos prometen candidatos para nuevos antibióticos [21,22].

Rattusin es un péptido de la familia de las α -defensinas que se encuentra abundantemente en las células de Paneth del intestino delgado de las ratas. Consta de 31 aminoácidos en los que se incluyen 5 residuos de cisteína con la capacidad de formar 2 enlaces disulfuro [23]. De acuerdo con la base de datos UNIPROT (Q4JEI2) los enlaces disulfuro del péptido se forman entre los residuos de cisteína Cys9-Cys21, Cys11-Cys19. Además, el dímero de Rattusin ha mostrado actividad antimicrobiana en contra de bacterias Gram negativas (*Salmonella tyhimurium* y *Klebsiella pneumoniae*) y Gram positivas (*Staphylococcus aureus* y *Lysteria monocytogenes*) [24].

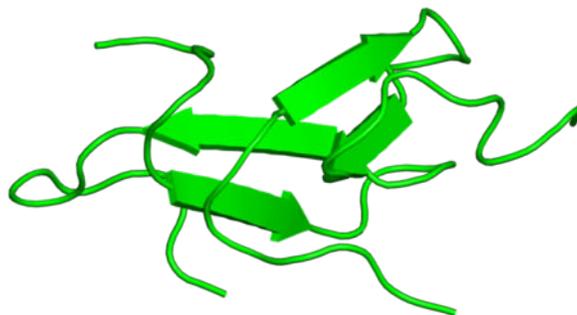


Figura 6. Estructura secundaria de Rattusin. PDBE (2018)

Hepcidin es un péptido antimicrobiano tipo catiónico que se produce en el hígado y fue detectado por primera vez en el plasma y orina humanos. Desde entonces, se han encontrado homólogos en ratones, perros, cerdos y aves [25]. Biológicamente es un

péptido con residuos de cisteínas que forman enlaces disulfuro, los cuales son esenciales para la actividad antimicrobiana del péptido [26]. Hepcidin consta de 25 aminoácidos con un peso molecular de 2.7 kDa y ha mostrado actividad antimicrobiana contra bacterias Gram positivas (*Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Bacillus subtilis*) y Gram negativas (*Salmonella*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Aeromonas*) además de actividad antifúngica (*Candida albicans*) [27]. De acuerdo con la base de datos de actividad microbiana y estructura de péptidos (DBAASP) Hepcidin requiere de la formación de 4 puentes disulfuro entre los residuos de Cys7 – Cys 23, Cys 10 – Cys 13, Cys 11 – Cys 19 y Cys14 – Cys 22 [28].

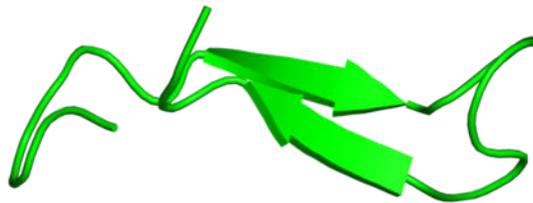


Figura 7. Estructura secundaria de Hepcidin. PDBE (2018)

Scygonadin es una proteína pequeña aislada del plasma seminal del cangrejo *Scylla serrata*. Compuesta por 102 aminoácidos y un peso de 11.27 kDa ha demostrado poseer actividad antibacteriana contra bacterias Gram positivas (*Micrococcus luteus*) y bacterias Gram negativas (*Aeromonas hydrophila*) [29]. De acuerdo con la base de datos de actividad microbiana y estructura de péptidos (DBAASP) Scygonadin requiere de la formación de un puente disulfuro entre los residuos Cys 33 – Cys 51 [28].

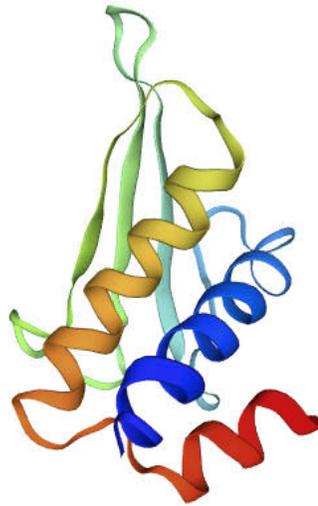


Figura 8. Estructura secundaria de Scygonadin. Biozentrum (2020)

1.3.3 Producción en tándems

La expresión de proteínas recombinantes en forma de tándems multiméricos es una estrategia comúnmente utilizada para la expresión de péptidos antimicrobianos; la cual consiste en copiar el gen de interés varias veces para aumentar la transcripción del gen y por ende la expresión del antimicrobiano [21].

Es importante mencionar que un mayor número de repeticiones no significa una mayor transcripción y traducción del gen; y que lo anterior depende mucho del péptido a expresar [30–32].

La producción en tándems de las proteínas de interés debe de ir de la mano de un método que permita la separación de estos tándems para poder evaluar la actividad de los monómeros de las proteínas de interés. La primera estrategia consiste en colocar la proteína de interés seguida de los aminoácidos Asn – Gly (NG) ya que estos aminoácidos permitirán la separación de los monómeros. La segunda estrategia consiste en colocar una unión flexible entre cada monómero la cual permitirá el plegamiento de cada uno sin necesidad de separarlos.

La hidroxilamina (NH_2OH) es una amina nucleofílica que rompe el enlace entre Asn – Gly (NG) en las proteínas; por lo que ha sido utilizada desde hace mucho tiempo para separar proteínas que tengan los sitios NG entre ellas [33]. Esto la ha convertido en una estrategia de separación de proteínas de interés.

En mamíferos, levaduras y bacterias existen codones que tienen un mayor tiempo de traducción los cuales se conocen como secuencias o uniones flexibles. Existen teorías en las que estas uniones flexibles actúan como “alentadores” de los ribosomas durante la traducción lo que reduce la velocidad de síntesis de proteínas permitiendo que los aminoácidos que ya forman parte de la cadena tengan más tiempo disponible para que la proteína se pliegue [34].

Estas secuencias flexibles se utilizan cuando se requiere cierto movimiento entre un dominio y dominio de una proteína. Usualmente están compuestos por aminoácidos pequeños, no polares (Gly) o polares (Ser o Thr) [35]. El hecho de que estos aminoácidos sean pequeños provee flexibilidad y permite la movilidad para conectar dominios funcionales. A parte la incorporación de Ser o Thr mantiene la estabilidad de las secuencias flexibles en soluciones acuosas mediante la formación de puentes de hidrógeno con las moléculas de agua; una de las uniones flexibles más conocida es GGGGS [36].

1.4 Justificación

Dada la importancia que las proteínas con múltiples enlaces disulfuro tienen en la industria alimenticia y farmacéutica, en este proyecto se plantea la expresión, purificación y evaluación de proteínas recombinantes con enlaces disulfuro en el citoplasma de *E. coli* utilizando CusF3H+ y SmbP como proteínas de fusión.

Las proteínas de estudio serán: Brazzein, proteína dulce; Miraculin, proteína modificadora del sabor; y los péptidos antimicrobianos: Ratussin, Hecpidin y Scygonadin. El objetivo de este estudio es producir estas proteínas y péptidos en *E. coli* utilizando las proteínas de fusión CusF3H+ y SmbP como proteínas de fusión que aumentarán la solubilidad de las proteínas de interés, además que facilitarán el proceso de purificación.

CAPÍTULO 2

2. ANTECEDENTES

En el 2007, Abe y colaboradores utilizaron *Aspergillus oryzae* como organismo hospedero para la producción de Miraculin. *A. oryzae* es bien utilizado para la producción de proteínas alimenticias como la neoculin, otra proteína dulce. En el estudio, se logró una eficiente producción de Miraculin. También se comprobó que para que se presente efecto de modificadora del sabor ésta debe estar como homodímero y no como monómero. Miraculin también ha sido expresada en tomate transgénico, lechuga y fresas transgénicas, sin embargo, se han obtenido bajos rendimientos de proteína producida, lo que ha sido reportado como un problema común al utilizar estos hospederos [37].

En el 2008, Assadi-Porter y colaboradores llevaron a cabo la expresión y purificación de la forma menor de la proteína dulce Brazzein en *E. coli* utilizando la proteína de fusión SUMO (Small Ubiquitin-like Modifier) y una etiqueta de histidinas (His₆). Para la expresión se His₆-SUMO-Brazzein se utilizaron diversas variantes de *E. coli* BL21(DE3), siendo las células BL21-CodonPlus (DE3)RIPL las que mostraron una mejor expresión de la proteína, la cual, al momento de ser expresada y purificada conservó la dulzura característica de esta proteína. Una de las ventajas del sistema de expresión utilizando SUMO es que esta proteína de fusión tiene la capacidad de solubilizar y estabilizar proteínas que contienen enlaces disulfuro. Asimismo, el uso de *E. coli* como microorganismo productor disminuyó los costos de producción [13].

En el año 2010, Peng y colaboradores expresaron el péptido Scygonadin en *E. coli* BL21(DE3), la expresión se realizó utilizando dos plásmidos diferentes y se purificó por IMAC en un paso. En la primera construcción, pTrc-CKS-Scygonadin obtuvieron 10.6 mg/L de Scygonadin recombinante, mientras que la segunda construcción, pET28-scygonadin obtuvieron 65.9 mg/L del péptido. Una vez purificado, se evaluó la actividad del péptido contra bacterias Gram positivas, Gram negativas, levaduras y hongos. Los resultados del péptido pTrc-CKS-Scygonadin mostraron actividad antimicrobiana contra *S. aureus* a una MIC de 15 – 30 μ M. Para pET28-Scygonadin contra *S. aureus* se reportó una MIC de 7.5 – 15 μ M. No se detectó actividad antimicrobiana al evaluar contra hongos y levaduras [29].

En el 2012, Lobstein y colaboradores, diseñaron una mutante de *E. coli* que carece de tiorredoxina reductasa y glutatión reductasa y que expresa la isomerasa DsbC. Para probar esta nueva mutante se evaluó la expresión de tres proteínas que contienen enlaces disulfuros en su estructura, luciferasa, uroquinasa y el activador tisular del plasminógeno. Los resultados muestran que las proteínas de prueba expresadas en una cepa de *E. coli* tipo silvestre se expresaron pero no se plegaron correctamente, sin embargo en presencia de un ambiente oxidado se observó un incremento en la expresión de proteínas correctamente plegadas, esto para el caso de la luciferasa y la uroquinasa, lo que sugiere que el estado oxidado del citoplasma es suficiente para el plegamiento de algunas proteínas. Sin embargo, para el activador tisular del plasminógeno el estado oxidado no fue suficiente, lo que indica que necesita la presencia de la isomerasa DsbC para un plegamiento correcto [5].

En el 2013, Hoon Kong y colaboradores desarrollaron un sistema de expresión de Brazzein en *Kluyveromyces lactis* utilizando un péptido señal de *Saccharomyces cerevisiae* y un péptido de fusión. *K. lactis*, al ser un organismo eucariota tiene la capacidad de realizar modificaciones post-traduccionales como la formación de los

enlaces disulfuro en las proteínas y el uso del péptido señal evita la necesidad de llevar a cabo una lisis celular para liberar la proteína de interés. Los resultados obtenidos indican que la Brazzein expresada en *K. lactis* estaba correctamente plegada en comparación con la expresada en *E. coli* [14].

En el 2015, Ariff y colaboradores optimizaron el proceso de purificación de Miraculin a partir de un extracto de la fruta utilizando IMAC y Ni(II) como ligando específico. Dicho proceso fue elegido ya que la secuencia de Miraculin cuenta con dos residuos de histidina los cuales son los responsables de la actividad modificadora del sabor, además son afines al Ni(II). Los resultados demuestran que la solución amortiguadora y el pH son factores importantes durante la purificación siendo pH 7 para el extracto crudo, Tris-HCl pH 7 para la solución amortiguadora de unión y 300 mM de imidazol como solución amortiguadora de elución. Dichas condiciones reportaron 80.3% de rendimiento y 97.5 % de pureza [18].

En el 2015, Sari y colaboradores llevaron a cabo la expresión y purificación de Hepsidin de camello utilizando células de *E. coli* Rosetta-gami B como hospedero y tiorredoxina como proteína de fusión. Una de las ventajas de utilizar Rosetta-gami B como hospedero es que esta cepa está modificada para llevar a cabo la formación de los enlaces disulfuro en el citoplasma de la bacteria. Los resultados mostraron la expresión de la proteína con un alto porcentaje de pureza al llevar a cabo una cromatografía por afinidad. Para la confirmación de la formación de los enlaces disulfuro se llevó a cabo un análisis de espectrometría de masas [25].

En el 2016, Cantú-Bustos y colaboradores estudiaron la expresión de la Proteína Verde Fluorescente (GFP) utilizando CusF como proteína de fusión, mediante su comparación con otras proteínas comerciales como GST y MBP. CusF mostró altos niveles de expresión equiparables con las proteínas comerciales y además se observó la disminución en la formación de cuerpos de inclusión. Además el uso de CusF facilitó la

etapa de purificación llevándose a cabo mediante Cromatografía de Afinidad a Metales Inmovilizados (IMAC) en este caso se utilizó Cu(II) como ligando específico, la pureza reportada fue de aproximadamente el 50% [7].

Así mismo, en el año 2016, Vargas y colaboradores estudiaron la expresión de GFP y RFP utilizando SmbP como proteína de fusión haciendo comparaciones con proteínas de fusión comerciales como MBP y GST. En comparación con CusF, SmbP demostró purezas mayores al 50% con un aumento en la solubilidad de las proteínas evaluadas con respecto a la solubilidad obtenida con las proteínas de fusión comerciales [10].

Con el objetivo de mejorar el grado de pureza de las proteínas de interés fusionadas con CusF, en el 2017, Vargas y colaboradores modificaron la secuencia de la proteína de fusión CusF mediante la adición de 3 residuos de histidina en el extremo N-terminal, ahora conocida como CusF3H+. Para probar la mejora en CusF3H+, se llevó a cabo una construcción utilizando GFP como proteína de interés, la expresión se llevó a cabo en *E. coli* BL21(DE3) y posteriormente se llevó a cabo una purificación por IMAC utilizando Ni(II) como ligando específico. Los resultados muestran una mejora con respecto al grado de pureza de GFP además de un aumento de la afinidad de la proteína con el ligando [8].

En el 2017, Boumaiza y colaboradores llevaron a cabo la expresión y purificación de Hepsidin de camello marcada con una etiqueta de histidinas y utilizando *Pichia pastoris* como organismo hospedero. Los resultados obtenidos son de 2.8 mg/L de proteína pura, además, el péptido purificado mostró una mayor actividad bactericida a menores concentraciones que las ya reportadas [38].

En el 2018, Ji y colaboradores realizaron la expresión en *E. coli* del péptido Rattusin. La expresión de Rattusin se llevó a cabo utilizando una etiqueta de histidinas en el extremo N-terminal y con un sitio de corte a CNBr. Una vez expresado, purificado y

removido de la etiqueta de histidinas, se obtuvo el péptido en forma de cuerpos de inclusión y sin la formación de los enlaces disulfuro; por lo que fue necesario hacer un replegamiento del péptido. Del experimento se obtuvieron 10 mg/L de medio de cultivo [23].

En los últimos años se han utilizado las proteínas SmbP y CusF3H+ en la producción de péptidos antimicrobianos. En 2020, Montfort-Gardeazabal y colaboradores expresaron y purificaron el péptido antimicrobiano VpDef en *E. coli* SHuffle obteniendo 5.28 mg/L de SmbP_VpDef y 5.88 mg/L de CusF3H+_VpDef, además mostró actividad contra *S. aureus* con un MIC de 150 µg/mL y *E. coli* con un MIC de 75 µg/mL. También en el año 2021, Montfort-Gardeazabal y colaboradores expresaron y purificaron el péptido antimicrobiano Bin1b en *E. coli* SHuffle obteniendo 4.4 mg/L de CusF3H+_Bin1b y SmbP_Bin1b. El péptido Bin1b expresado con estos tags también mostró actividad antimicrobiana contra *S. aureus* y *E. coli* [39,40].

Finalmente, en el año 2021 Perez-Perez y colaboradores expresaron en *E. coli* BL21(DE3) el péptido antimicrobiano LL-37 utilizando SmbP como proteína de fusión, produciendo 3.6 mg/L de SmbP_LL-37. Así mismo se reportó actividad antimicrobiana contra bacterias como *S. aureus* y *E. coli* [41].

2.1 Aportación científica

Durante los últimos años, ha surgido una creciente demanda de edulcorantes con bajo contenido calórico; junto con esta tendencia, también hay un aumento en la demanda de productos sanos y naturales. Por lo tanto, para hacer frente a esta necesidad, existe una intensa y continua búsqueda de edulcorantes alternativos. Los edulcorantes alternativos que se han desarrollado muestran un perfil edulcorante muy intenso por lo que son mucho más dulces que la sacarosa y por lo tanto pueden usarse en cantidades diminutas, lo que da lugar a una adición casi insignificante al recuento de

calorías. Además, los edulcorantes alternativos e intensos también se pueden usar en alimentos para diabéticos, ya que no desencadenan una demanda de insulina en estos pacientes [42].

Por otra parte, el rápido aumento de las infecciones resistentes a los medicamentos ha representado un serio desafío para las terapias antimicrobianas. Debido al fracaso de los antibióticos más potentes para matar "superbacterias" surge la urgente necesidad de desarrollar otros agentes de control como los péptidos antimicrobianos [43].

El desarrollo de este proyecto permitirá utilizar a la bacteria *Escherichia coli* como una fábrica celular microbiana para la expresión de proteínas complejas con múltiples enlaces disulfuro mediante el uso de las proteínas de fusión como CusF3H+ y SmbP las cuales permitirán la mejora en el proceso de purificación aumentando la pureza de la proteína obtenida. Además, el desarrollo de nuevas tecnologías de expresión y purificación de proteínas dulces, modificadoras del sabor y péptidos antimicrobianos permitirá la obtención de nuevos productos que pueden ser utilizados en la industria alimenticia y farmacéutica.

CAPÍTULO 3

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 Hipótesis

El uso de CusF3H+ y SmbP como proteínas de fusión aumentan la solubilidad y facilita el proceso de purificación de proteínas recombinantes con enlaces disulfuro expresadas en el citoplasma de *Escherichia coli*.

3.2 Objetivo General

Expresión, purificación y evaluación de péptidos antimicrobianos, proteínas dulces y modificadoras del sabor con enlaces disulfuro en el citoplasma de *E. coli* utilizando CusF3H+ y SmbP como proteínas de fusión.

3.3 Objetivos Específicos

1. Construir plásmidos que contengan las secuencias de interés de las proteínas Brazzein y Miraculin y de los péptidos Rattusin, Hepcidin y Scygonadin
2. Expresar las proteínas Brazzein y Miraculin y los péptidos Rattusin, Hepcidin y Scygonadin en el citoplasma de *E. coli*.
3. Purificar las proteínas Brazzein y Miraculin y los péptidos Rattusin, Hepcidin y Scygonadin por medio de cromatografía por afinidad.
4. Evaluar la actividad antimicrobiana de los péptidos Rattusin, Hepcidin y Scygonadin.
5. Valorar la actividad dulce y modificadora del sabor de Brazzein y Miraculin con un análisis sensorial.

CAPÍTULO 4

4. METODOLOGÍA

4.1 Materiales, reactivos y equipo

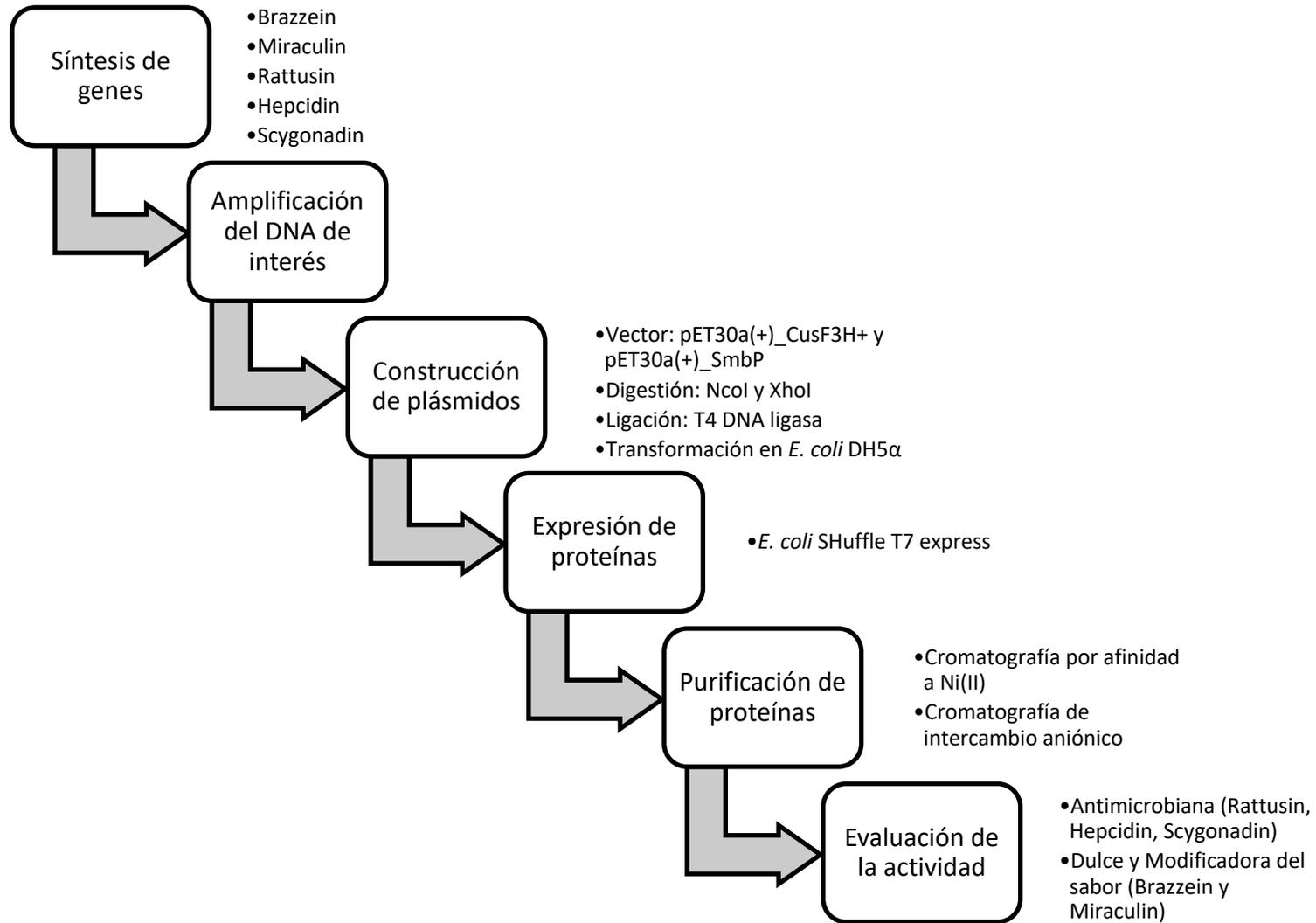
Los materiales empleados en este proyecto incluyen: tubos eppendorf de 1.5 y 2 mL marca Axygen, puntillas para micropipeta de volumen variable de 20 μ L, 200 μ L y 1000 μ L marca Eppendorf y BasicPette , tubos falcon de 15 mL y 50 mL marca Corning, tubos de cultivo con tapón de rosca marca KIMAX, matraces de 125 mL y 250 mL marca Pyrex y matraces triptinizados de 500 mL marca KIMAX.

Para la extracción del ADN plasmídico y la extracción a partir de gel de agarosa y cambio de buffer después de la digestión con enzimas de restricción, se utilizaron Kits de la marca QIAGEN. Los genes correspondientes a las proteínas Brazzein y Miraculin se mandaron sintetizar con la compañía GenScript. Los oligonucleótidos para los genes que codifican para la proteína Miraculin fueron sintetizados en Integrated DNA Technologies. Los reactivos para PCR, las enzimas de restricción y la enzima T4 DNA ligasa correspondían a la marca New England Biolabs. Así mismo la cepa de expresión *Escherichia coli* SHuffle T7 express corresponde a la marca New England Biolabs y para el crecimiento de esta se utilizó el Caldo Luria Bertani (LB) marca Bio Basic.

Para la purificación de las proteínas se utilizaron las siguientes columnas comerciales: HiTrap™ IMAC FF para Cromatografía por Afinidad y HiTrap™ Q para Cromatografía por Intercambio Aniónico.

Para la amplificación de los genes que codifican para las proteínas de interés se utilizó el termociclador marca Techne modelo 3 Prime. El crecimiento de las bacterias se llevó a cabo utilizando una incubadora con agitación marca LabTech, modelo LSI-3016. Para la recolección de los sedimentos celulares se utilizó una ultracentrífuga Sorval Lynx de Thermo Scientific. Para la visualización de la amplificación de los genes de interés, el análisis de restricción por medio de geles de agarosa y las electroforesis en geles de poliacrilamida con gradiente desnaturizante se llevaron a cabo utilizando una cámara de electroforesis marca BioRad. La purificación de las proteínas se realizó utilizando el equipo Äkta Primeplus, marca General Electric.

4.2 Metodología General



4.3 Síntesis de Genes

La secuencia de aminoácidos que codifican para las proteínas se obtuvieron de la base de datos UNIPROT las cuales fueron optimizadas y sintetizadas por GenScript. La construcción CusF3H+_Brazzein fue sintetizada y clonada por GenScript en el plásmido pET30a(+). Cada ADN fue recibido en un papel filtro o liofilizados y se recuperaron con 50 µL de H₂O MQ.

4.4 Amplificación de Insertos

Para la amplificación de Miraculin se diseñaron los oligonucleótidos delantero y reverso. Los iniciadores fueron diseñados incluyendo el sitio de corte para NcoI (CCATGG) y XhoI (CTCGAG). La concentración final para cada uno de los oligonucleótidos fue de 20 pmoles/µL.

Tabla 4. Oligonucleótidos usados para la amplificación de Miraculin

Oligonucleótido	Secuencia
Delantero	5' – CCA TGG CTG ACA AGT GCA AG – 3'
Reverso	5' – CTC GAG TTA ATA TTC GCA GTA AT – 3'

La reacción para la amplificación se llevó a cabo en tubos para PCR de 200 µL utilizando la enzima *Vent* DNA polimerasa de New England Biolabs. En la Tabla 5 se muestran las cantidades de reactivos utilizados para la reacción de PCR, junto con las condiciones de la reacción en el termociclador.

Tabla 5. Componentes y condiciones para la amplificación de Miraculin

Reactivo	Cantidad	Condiciones
ADN Molde (10 ng)	1 μ L	Desnaturalización Inicial: 95 °C por 2 minutos
dNTP's (10 mM/ μ L)	1.5 μ L	Desnaturalización: 95 °C por 1 minuto
Oligonucleótido delantero (20 pmol/ μ L)	3 μ L	Alineamiento: 58 °C por 1 minuto
Oligonucleótido reverso (20 pmol/ μ L)	3 μ L	Elongación: 72 °C por 1 minuto 30 ciclos
Solución amortiguadora 10x	5 μ L	
ADN polimerasa (2 U/ μ L)	0.5 μ L	Elongación Final: 72 °C por 5 minutos
H ₂ O MQ	36 μ L	
Volumen total de reacción	50 μ L	

El ADN amplificado fue extraído mediante la técnica de extracción en gel de agarosa utilizando el kit QIAquick Gel Extraction de QIAGEN.

4.5 Construcción de plásmidos

La construcción de los plásmidos se llevó a cabo utilizando el método de clonación clásico: digestión, ligación, transformación y selección de transformantes. Se utilizó como vector el plásmido pET30a(+), resistente a kanamicina al cual se le agregaron las secuencias de las proteínas de fusión CusF3H+ y SmbP; además contiene la secuencia de corte para la enzima enteroquinasa. En la Tabla 6 se enlistan las construcciones de este proyecto.

Tabla 6. Lista de construcciones

Plásmido		pET30a(+)		
Proteína de fusión	CusF3H+	SmbP	PelB_SmbP	
Proteínas de interés	Brazzein	Brazzein	Brazzein	
	Brazzein3xNG	Brazzein3xNG	Brazzein3xNG	
	Brazzein FLEX	Brazzein FLEX	Brazzein FLEX	
	Miraculin	Miraculin	Miraculin	
	Rattusin2xNG	Rattusin2xNG	Rattusin2xNG	
	Rattusin3xNG	Rattusin3xNG	Rattusin3xNG	
	Hepcidin FLEX	Hepcidin FLEX	Hepcidin FLEX	
	Scygonadin	Scygonadin	Scygonadin	
	Scygonadin FLEX	Scygonadin FLEX	Scygonadin FLEX	

*2xNG y 3xNG representan aquellas construcciones en las que se repiten 2 o 3 veces la secuencia de la proteína de interés y que se encuentran separadas por los aminoácidos NG del sitio hidroxilamina.

**La palabra FLEX representa aquellas construcciones en donde se utilizó la secuencia GGGGSGGGGSGGGGS que corresponde a las uniones flexibles.

4.5.1 Digestión de los plásmidos pET30a(+)_CusF3H+ y pET30a(+)_SmbP

La digestión se llevó a cabo utilizando las enzimas de restricción NcoI y XhoI (NEB). En las Tablas 7 y 8 se muestran los reactivos y condiciones generales que se llevaron a cabo para la digestión de los plásmidos y los insertos respectivamente. Para todas las digestiones se utilizó la solución amortiguadora 3.1 de NEB.

Tabla 7. Componentes y condiciones para la digestión de los plásmidos pET30a(+)_CusF3H+ y pET30a(+)_SmbP

Componente	Cantidad	Condiciones
Plásmido (2000 ng)	19 μL *	
Solución amortiguadora (3.1) 10x	5 μL	
H ₂ O MQ	3 μL	Incubación a 37 °C por 3 horas
XhoI (20 U/ μL)	1 μL	
NcoI (20 U/ μL)	1 μL	
SAP (1U/ μL)	1 μL	Incubación 37 °C por 30 minutos
Volumen total de reacción	30 μL	

Tabla 8. Componentes y condiciones para la digestión del inserto

Componente	Cantidad	Condiciones
Inserto (2000 ng)	16 μL *	
Solución amortiguadora (3.1) 10x	3 μL	
NcoI (20 U/ μL)	1 μL	Incubación 37 °C por 2.5 horas
XhoI (20 U/ μL)	1 μL	
H ₂ O MQ	9 μL	
Volumen total de reacción	30 μL	

*El volumen (μL) de plásmido e inserto pueden variar.

Una vez finalizada la digestión, se realizó la purificación del plásmido e inserto usando el kit QIAquick Gel Extraction de QIAGEN.

4.5.2 Ligación

Para todas las ligaciones se utilizó la relación molar 3:1 (inserto:vector). Para el cálculo de esta relación se utilizó la ecuación #1.

$$ng \text{ inserto} = \frac{ng \text{ de vector} \times \text{tamaño de inserto (Kb)}}{\text{Tamaño del vector (Kb)}} \times \text{relación molar} \frac{\text{inserto}}{\text{vector}}$$

Se utilizó la enzima T4 DNA ligasa de BioBasic y en la Tabla 9 se muestran los reactivos y las condiciones generales para la reacción.

Tabla 9. Componentes y condiciones para la ligación

Componente	Ctrl -	3:1
Plásmido (34.5 ng) *	3 µL	3 µL
Inserto (10 ng/µL) *	0 µL	1 µL
Solución amortiguadora 10x	2 µL	2 µL
T4 DNA ligasa (5U/µL)	0.5 µL	1 µL
H ₂ O MQ	14.5 µL	13 µL
Volúmen de reacción 20 µL		
Incubación: 22 °C / 1 hora y 4 °C / 48 horas		
Desactivación de enzima: 65 °C / 10 minutos		

*La concentración del plásmido e inserto varían según la ecuación #1.

4.5.3 Transformación en *E. coli* DH5 α

La transformación se llevó a cabo en células rubidio-competentes de la cepa *E. coli* DH5 α , en un tubo eppendorf de 1.5 mL se colocaron 5 μ L del producto de ligación más 50 μ L de las células, se incubaron en hielo por 30 min y posteriormente se llevó a cabo el choque térmico a 44 °C por 45 segundos, una vez finalizada la reacción se incubó en hielo por 2 min. Después se añadieron 800 μ L de caldo LB y se mezcló suavemente, la reacción se incubó a 37 °C con agitación (200 rpm) por 30 minutos. Posteriormente los tubos se centrifugaron a 13,300 rpm por 2 minutos, se retiró el exceso de medio dejando aproximadamente 100 μ L del mismo en el cual las células fueron resuspendidas y sembradas en placas de LB/kanamicina mediante la técnica de extensión por varilla, finalmente las placas se incubaron a 37 °C por 16 horas.

4.5.4 Selección de transformantes y extracción de ADN plasmídico

De las placas con LB/kanamicina que fueron sembradas previamente se seleccionaron 3 colonias, se inocularon en 6 mL de caldo LB/kanamicina y se cultivaron a 37 °C con agitación (200 rpm) por 16 horas. Posteriormente se recolectaron las células en tubos eppendorf de 2 mL mediante centrifugación a 13,300 rpm por 2 minutos. Una vez obtenido el sedimento celular se extrajo el ADN plasmídico utilizando el kit QIAprep Spin Miniprep de QIAGEN.

4.5.5 Confirmación de insertos por PCR

Utilizando el ADN plasmídico previamente extraído se realizó una PCR utilizando los oligonucleótidos T7 para confirmar la presencia de los insertos. La Tabla 10 muestra los reactivos y las condiciones generales que se utilizaron para la reacción.

Tabla 10. Componentes y condiciones para la confirmación de insertos

Reactivo	Cantidad	Condiciones
ADN Molde (20 ng)	10 μ L	Desnaturalización Inicial: 95 °C por 2 minutos
dNTP's (10 mM/ μ L)	1.5 μ L	Desnaturalización: 95 °C por 1 minuto
Oligonucleótido delantero T7 (20 pmol/ μ L)	3 μ L	Alineamiento: 57 °C por 1 minuto
Oligonucleótido reverso T7 (20 pmol/ μ L)	3 μ L	Elongación: 72 °C por 1 minuto
Amortiguador de reacción 10x	5 μ L	30 ciclos
ADN polimerasa (5U/ μ L)	0.5 μ L	
H ₂ O MQ	27 μ L	Elongación Final: 72 °C por 5 minutos
Volumen total de reacción	50 μ L	

4.6 Expresión de Proteínas

4.6.1 Transformación en *E. coli* SHuffle T7 express

Utilizando un ADN plasmídico positivo para las construcciones se llevó a cabo la transformación en la cepa *E. coli* SHuffle T7 express la cual se utiliza para la expresión de proteínas con enlaces disulfuro. En un tubo eppendorf de 1.5 mL se colocaron 20 μ L de células rubidio-competentes más 1.5 μ L (10 – 15 ng) de ADN plasmidico, se incubaron en hielo por 30 min y posteriormente se llevó a cabo el choque térmico a 44 °C por 45 segundos, una vez finalizada la reacción se incubó en hielo por 2 min. Después se añadieron 800 μ L de caldo LB y se mezcló suavemente, la reacción se incubó a 37 °C con agitación (200 rpm) por 30 minutos. Posteriormente los tubos se centrifugaron a 13,300 rpm por 2 min, se retiró el exceso de medio dejando aproximadamente 100 μ L del mismo en el cual las células fueron resuspendidas y sembradas en placas de LB/kanamicina mediante la técnica de extensión por varilla, finalmente las placas se incubaron a 37 °C por 16 horas.

4.6.2 Microexpresión

De las placas con células transformadas, se tomaron diversas colonias las cuales fueron sembradas en un tubo con 2 mL de caldo LB/kanamicina y se incubaron a 37 °C con agitación (200 rpm) hasta que alcanzaran una D.O.₆₀₀ entre 0.4 – 0.6, cuando los inóculos alcanzaron esta D.O. se agregaron 2 µL de Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG) 0.1 M alcanzando una concentración final de 0.2 mM; después se incubaron a 25 °C con agitación (200 rpm) por 16 horas.

Para la preparación de las muestras se utilizaron dos métodos. En el primero, en un tubo eppendorf de 2 mL se centrifugaron las células a 13,300 rpm por 2 minutos. El sedimento celular se resuspendió en 120 µL de H₂O MQ después se agregaron 40 µL de solución amortiguadora, se mezcló y se llevó a hervir por 10 minutos. Los tubos se centrifugaron a 13,300 rpm por 10 minutos y se retiró el sobrenadante que contiene la fracción soluble. Para obtener la fracción insoluble el sedimento celular anterior se lavó cuidadosamente con 120 µL de H₂O MQ, se retiró el agua y se agregaron 120 µL de una solución de 8 M urea 60 mM Tris, se resuspendió el sedimento y se llevó a hervir por 10 minutos. Finalmente, los tubos se centrifugaron a 13,300 rpm por 10 min.

En el segundo, después de recolectar el sedimento celular, las células se resuspendieron en 100 µL de solución amortiguadora (50 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 8) y se agregaron 100 µL de perlas de vidrio de 0.1 mm de diámetro. La mezcla se agitó con vórtex por 4 minutos, para finalizar el sobrenadante se recuperó por centrifugación a 13,300 rpm por 1 minuto.

Para la visualización de la expresión de las proteínas de interés, se corrió un gel de poliacrilamida con gradiente desnaturante (SDS-PAGE) al 15%. Una vez terminada la electroforesis, el gel de acrilamida se tiñó con Azul de Coomassie.

4.6.3 Escalamiento de la expresión de proteínas

De las expresiones piloto se eligieron las colonias que mostraban mejor expresión de las proteínas de interés. La expresión se llevó a cabo en matraces triptinizados de 500 mL hasta completar un volumen de expresión final de 1 litro.

En un matraz triptinizado de 500 mL se agregaron 125 mL de caldo LB con 125 μ L de kanamicina, los matraces fueron inoculados con un cultivo previamente crecido de la colonia seleccionada. Los matraces se incubaron a 37 °C con agitación (200 rpm) hasta que alcanzaron una D.O.₆₀₀ de 0.4 – 0.6, una vez alcanzada esta D.O. se comenzó la inducción con 125 μ L de IPTG 0.1 M a 30 °C con agitación (200 rpm) por 16 horas.

Posteriormente se recolectó el sedimento celular en frascos de plástico de 250 mL utilizando una centrífuga refrigerada a 4 °C, 10,000 rpm por 20 min. Finalmente los frascos con el sedimento celular se congelaron a -20°C.

4.7 Purificación de Proteínas

Para la purificación de las proteínas se utilizaron dos técnicas cromatográficas: la primera mediante Cromatografía por Afinidad a Ni(II) y la segunda por Cromatografía por Intercambio Iónico del tipo Aniónico.

4.7.1 Lisis celular y obtención de clarificados

El sedimento obtenido de la expresión de las proteínas de interés fue resuspendido en 30 mL de la solución amortiguadora de unión (50 mM Tris, 500 mM NaCl, 5 mM imidazol pH 8). Las células resuspendidas fueron lisadas utilizando una cámara de lisado con perlas de vidrio. El lisado obtenido fue centrifugado a 10,000 rpm a 4 °C durante 20 minutos. Al finalizar la centrifugación se separó el clarificado para su purificación.

4.7.2 Purificación: Cromatografía por Afinidad

La purificación mediante cromatografía por afinidad se llevó a cabo utilizando la columna comercial HiTrap™ IMAC FF de 1 mL de la marca GE Healthcare previamente cargada con una solución de NiSO₄ 0.1 M. Para la purificación se utilizó el equipo ÄKTA Primeplus, marca GE.

Para esta cromatografía se utilizaron tres soluciones amortiguadoras: la primera que corresponde a una solución amortiguadora de unión (50 mM Tris, 500 mM NaCl, 5 mM imidazol, pH 8) una solución amortiguadora de lavado (50 mM Tris, 500 mM NaCl, 10 mM imidazol, pH 8) y una solución amortiguadora de elución (50 mM Tris 500 mM NaCl, 200 mM imidazol, pH 8).

La columna se equilibró con 5 volúmenes de columna de la solución amortiguadora de unión. Una vez equilibrada la columna se cargó el clarificado de proteínas con un flujo de 0.5 mL/min a una presión de 0.5 MPa. Posteriormente se lavó la columna con la solución amortiguadora de lavado hasta que disminuyera la absorbancia y finalmente se agregó la solución amortiguadora de elución, de esta elución se colectaron fracciones de 0.5 mL. Las fracciones obtenidas se analizaron mediante SDS-PAGE al 15%

4.7.3 Diálisis para la remoción de imidazol y NaCl

Utilizado las fracciones previamente obtenidas se llevó a cabo una diálisis para eliminar el imidazol y NaCl. Estas fracciones se colocaron en una membrana para diálisis SnakeSkin Pleated (10K MWCO) y posteriormente se sumergieron en una solución amortiguadora fría de 50 mM Tris, pH 8. Se hicieron 3 diálisis de 1 hora cada una y una cuarta diálisis durante toda la noche.

4.7.4 Cuantificación de Proteínas

Para la cuantificación proteínica se utilizó el método Bradford utilizando como estándar de referencia la Albúmina de Suero Bovino (BSA 10 mg/mL). Se prepararon distintos estándares con las siguientes concentraciones: 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 mg/mL. El análisis se llevó a cabo en una placa de 96 posillos, en cada posillo se colocaron 5 μ L de estándar más 250 μ L del reactivo Bradford, se incubó por 5 min con intervalos de agitación de 10 segundos cada uno y se realizó la medición a 595 nm utilizando el lector de placas Multiskan 2 de Thermo Scientific.

Las fracciones se trataron de la misma manera (5 μ L muestra + 250 μ L reactivo). Posteriormente se realizó el análisis y el cálculo para conocer la concentración proteínica de cada fracción.

Para la cuantificación de proteínas también se utilizó el método del ácido bicinonínico (BCA) utilizando como estándar de referencia BSA (5 mg/mL). Se prepararon estándares con las siguientes concentraciones 25, 50, 100, 200, 300, 400 y 500 μ g/mL. En un tubo eppendorf de 1.5 mL se colocaron 100 μ L de cada estándar más 1 mL de reactivo de trabajo, se incubaron a 37 °C por 30 minutos. La reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente y después se colocaron en celdas de plástico. La medición se realizó a 562 nm en el espectofotómetro UV-Vis JenWay 7305.

4.7.5 Remoción de tag

La separación de la proteína de fusión se realizó utilizando la enzima enteroquinasa de cadena ligera de NEB (2 μ g/mL). Para la digestión se tomó 1 mg de proteína y 3.2 μ L de la enzima (0.0064 μ g), la reacción se incubó a 25 °C durante 20 horas. Posteriormente la digestión se analizó por SDS-PAGE al 15%.

Para las repeticiones de corte, se utilizó la enzima enteroquinasa porcina de cadena ligera de GenScript (100 µg/µL). La digestión se llevó a cabo a 22 °C durante 22 horas. Una vez terminada la reacción, ambas proteínas se separaron mediante cromatografía por intercambio aniónico.

4.7.6 Purificación: Cromatografía por Intercambio Aniónico

Para esta cromatografía se empleó la columna HiTrap™ Q 1 mL utilizando el equipo ÄKTA Prime Plus. Se equilibró la columna con 5 volúmenes de la solución amortiguadora de unión (50 Tris, pH 8) con un flujo de 0.5 mL/minuto a una presión de 0.5 MPa. Posteriormente se cargó la columna con la proteína previamente purificada por IMAC y digerida con la enteroquinasa. Para la elución de la proteína se utilizó una solución amortiguadora de elución (50 mM Tris, 1M NaCl pH 8) y se aplicó un gradiente de elución de 40 volúmenes de columna que iba de 0-100% de concentración de solución amortiguadora de elución.

4.8 Evaluación de la actividad

4.8.1 Actividad Dulce – Brazzein

La muestra se dializó con agua y se concentró utilizando un centrífugo (Microcon YM-3, MWCO 3 kDa) a 13,000xg por 40 minutos repitiendo el proceso de 4-6 veces. Se preparó una solución control de sacarosa al 1%. Se tomaron 200 µL de la solución control y se colocaron en la parte anterior de la lengua. La boca se enjuagó con agua corriente y posteriormente se colocaron 200 µL de la proteína. Los resultados se reportaron como presencia o ausencia del sabor.

4.8.2 Actividad Modificadora del sabor – Miraculin

La muestra se dializó en una solución de 170 mM NaCl, pH 3.7. Se prepararon una serie de estándares de sacarosa (0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25, 0.30, 0.40, 0.45 y 05 M) y se colocaron 200 μ L de cada uno en la parte anterior de la boca. Entre cada estándar, la boca se enjuagó con agua corriente. Al finalizar la serie de estándares, se colocaron 500 μ L de la proteína y se mantuvieron en la boca por 3 minutos, al terminar el tiempo, la boca se enjuagó con agua corriente y posteriormente se agregaron 5 mL de una solución 20 mM citrato de sodio. La evaluación de la intensidad de la dulzura se evaluó con la elección de una de las soluciones estándar de sacarosa.

4.8.3 Actividad Antimicrobiana – Hecpidin, Scygonadin y Rattusin

Los péptidos antimicrobianos se evaluaron con un ensayo de concentración mínima inhibitoria contra *Staphylococcus aureus* una de las bacterias de grupo ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter spp*).

Para la preparación del inóculo, a partir del cultivo de 12 horas se hizo una dilución 1:250 en un tubo de cristal con rosca con 5 mL de caldo Mueller-Hinton y se incubó a 37 °C y 150 rpm. El inóculo se ajustó a 0.2 de DO₆₀₀ y se realizó 1:100 en un tubo de 1.5 mL con medio fresco a un volumen final de 1 mL

Para la preparación de la placa (96 posillos) se incluyeron los siguientes controles (por triplicado), 1) control de esterilidad: posillos con 200 μ L de caldo LB y 2) control de crecimiento: 100 μ L de caldo LB con 100 μ L de inóculo. En la placa se agregaron 100 μ L de medio MH a cada posillo, con excepción de los pozos de la primera fila, en donde se realizaron las diluciones de los compuestos a estudiar. Se agregaron 200 μ L de la proteína a probar en los pozos de la primera fila. La concentración del compuesto fue 2X para que al agregar el inóculo se diluyera 1:2 y se obtuviera la concentración deseada.

Se realizaron las diluciones seriales transfiriendo 100 μL a cada pozo de la serie hasta desechar los últimos 100 μL . Se agregaron 100 μL de la dilución del inóculo, previamente realizada, a los pozos correspondientes en la placa para determinar la MIC. Tras agregar el inóculo, las placas se sellaron para evitar que accidentalmente la tapa se mueva durante la manipulación, y se incubaron a 37 °C y 150 rpm durante 16 – 20 horas. Transcurrido este tiempo, la placa se leyó en el espectrofotómetro para determinar la densidad óptica.

CAPÍTULO 5

5. RESULTADOS

5.1 Síntesis de genes

La secuencia de aminoácidos que codifica para las proteínas Brazzein, Miraculin y Scygonadin se enviaron a la empresa GenScript y fueron optimizadas para su expresión en *E. coli*. Para las secuencias se utilizaron los sitios de restricción NcoI (CCATGGCT) y XhoI (CTCGAG). En las Tablas 11, 12 y 13 se muestran las secuencias de aminoácidos, la secuencia de ADN y el peso de cada gen. En azul se señalan los sitios de restricción.

Tabla 11. Secuencia de nucleótidos y aminoácidos que codifican para Brazzein

Secuencia de nucleótidos y aminoácidos que codifican para Brazzein																	
CCATGGCT	GAC	AAG	TGC	AAG	AAA	GTG	TAC	GAG	AAC	TAT	CCG	GTT	AGC	AAA	TGC		
NcoI	D	K	C	K	K	V	Y	E	N	Y	P	V	S	K	C	15	
CAG	CTG	GCG	AAC	CAA	TGC	AAC	TAC	GAC	TGC	AAG	CTG	GAT	AAA	CAC	GCG	CGT	
Q	L	A	N	Q	C	N	Y	D	C	K	L	K	D	H	A	R	32
AGC	GGC	GAG	TGC	TTC	TAT	GAC	GAA	AAG	CGT	AAC	CTG	CAG	TGC	ATC	TGC	GAT	
S	G	E	C	F	Y	D	E	K	R	N	L	Q	C	I	C	D	49
TAC	TGC	GAA	TAT	TAA	CTCGAG												
Y	C	E	Y	Stop	XhoI											53	
Pares de bases		Aminoácidos			Peso en kDa			Punto Isoeléctrico (PI)									
159		53			6.37			6.71									

Tabla 12. Secuencia de nucleótidos y aminoácidos que codifican para Miraculin

Secuencia de nucleótidos y aminoácidos que codifican para Miraculin																	
CCATGGCT	GAC	AGC	GCG	CCG	AAC	CCG	GTG	CTG	GAC	ATC	GAT	GGC	GAG	AAG	CTG		
NcoI	D	S	A	P	N	P	V	L	D	I	D	G	E	K	L	15	
CGT	ACC	GGT	ACC	AAC	TAC	TAT	ATT	GTG	CCG	GTT	CTG	CGT	GAT	CAC	GGT	GGC	
R	T	G	T	N	Y	Y	I	V	P	V	L	R	D	H	G	G	32
GGT	CTG	ACC	GTG	AGC	GCG	ACC	ACC	CCG	AAC	GGT	ACC	TTT	GTT	TGC	CCG	CCG	
G	L	T	V	S	A	T	T	P	N	G	T	F	V	C	P	P	49
CGT	GTG	GTT	CAG	ACC	CGT	AAG	GAA	GTG	GAC	CAC	GAT	CGT	CCG	CTG	GCG	TTC	
R	V	V	Q	T	R	K	E	V	D	H	D	R	P	L	A	F	66
TTT	CCG	GAG	AAC	CCG	AAA	GAA	GAC	GTG	GTT	CGT	GTT	AGC	ACC	GAT	CTG	AAC	
F	P	E	N	P	K	E	D	V	V	R	V	S	T	D	L	N	83
ATC	AAC	TTT	AGC	GCG	TTC	ATG	CCG	TGC	CGT	TGG	ACC	AGC	AGC	ACC	GTG	TGG	
I	N	F	S	A	F	M	P	C	R	W	T	S	S	T	V	W	100
CGT	CTG	GAC	AAG	TAC	GAT	GAG	AGC	ACC	GGC	CAG	TAT	TTC	GTG	ACC	ATT	GGC	
R	L	D	K	Y	D	E	S	T	G	Q	Y	F	V	T	I	G	117
GGT	GTT	AAA	GGC	AAC	CCG	GGT	CCG	GAA	ACC	ATC	AGC	AGC	TGG	TTT	AAG	ATT	
G	V	K	G	N	P	G	P	E	T	I	S	S	W	F	K	I	134
GAG	GAA	TTC	TGC	GGC	AGC	GGT	TTT	TAC	AAA	CTG	GTG	TTC	TGC	CCG	ACC	GTT	
E	E	F	C	G	S	G	F	Y	K	L	V	F	C	P	T	V	151
TGC	GGC	AGC	TGC	AAG	GTG	AAA	TGC	GGC	GAC	GTT	GGT	ATC	TAT	ATT	GAT	CAA	
C	G	S	C	K	V	K	C	G	D	V	G	I	Y	I	D	Q	168
AAA	GGT	CGT	CGT	CGT	CTG	GCG	CTG	AGC	GAC	AAG	CCG	TTC	GCG	TTT	GAG	TTC	
K	G	R	R	R	L	A	L	S	D	K	P	F	A	F	E	F	185
AAC	AAA	ACC	GTT	TAC	TTT	TAA	CTCGAG										
N	K	T	V	Y	F	Stop	XhoI										191
Pares de bases		Aminoácidos			Peso en kDa			Punto Isoeléctrico (PI)									
573		191			21.35			7.7									

Tabla 13. Secuencia de nucleótidos y aminoácidos que codifican para scygonadin

Secuencia de nucleótidos y aminoácidos que codifican para scygonadin																	
CCATGGCT	GGT	CAG	GCG	CTG	AAC	AAG	CTG	ATG	CCG	AAA	ATC	GTG	AGC	GCG	ATC		
NcoI	G	Q	A	L	N	K	L	M	P	K	I	V	S	A	I	15	
ATT	TAC	ATG	GTT	GGT	CAA	CCG	AAC	GCG	GGC	GTG	ACC	TTC	CTG	GGT	CAC	CAG	
I	Y	M	V	G	Q	P	N	A	G	V	T	F	L	G	H	Q	32
TGC	CTG	GTG	GAG	AGC	ACC	CGT	CAA	CCG	GAC	GGT	TTT	TAT	ACC	GCG	AAG	ATG	
C	L	V	E	S	T	R	Q	P	D	G	F	Y	T	A	K	M	49
AGC	TGC	GCG	AGC	TGG	ACC	CAC	GAT	AAC	CCG	ATC	GTT	GGT	GAA	GGC	CGT	AGC	
S	C	A	S	W	T	H	D	N	P	I	V	G	E	G	R	S	66
CGT	GTG	GAG	CTG	GAA	GCG	CTG	AAA	GGC	AGC	ATT	ACC	AAC	TTC	GTG	CAG	ACC	
R	V	E	L	E	A	L	K	G	S	I	T	N	F	V	Q	T	83
GCG	AGC	AAC	TAC	AAG	AAA	TTT	ACC	ATC	GAC	GAG	GTT	GAA	GAT	TGG	ATT	GCG	
A	S	N	Y	K	K	F	T	I	D	E	V	E	D	W	I	A	100
AGC	TAT	CTCGAG															
S	Y	XhoI															102
Pares de bases		Aminoácidos		Peso en kDa		Punto Isoeléctrico (PI)											
306		102		11.27		6.09											

5.2 Clonación

5.2.1 Construcciones con las proteínas de fusión CusF3H+, SmbP y PelB_SmbP

Todos los genes que codifican para las proteínas de interés se sintetizaron y optimizaron para su expresión en *E. coli*; y fueron clonadas en el plásmido pET30a(+) bajo los siguientes lineamientos: las proteínas de fusión se clonaron entre los sitios de restricción de NdeI y KpnI; seguidas del sitio de reconocimiento de la enteroquinasa, enzima que se utilizó para separar la proteína de fusión de la proteína de interés, las cuales están clonadas entre los sitios de restricción NcoI y XhoI.

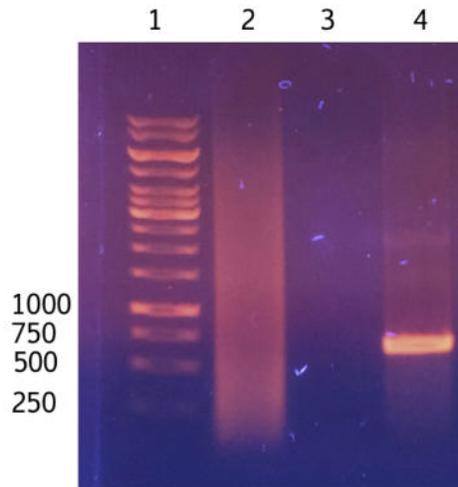


Figura 10. Amplificación de miraculin en gel de agarosa al 0.7%. El carril 1 muestra el marcador de peso molecular, en el carril 2 se muestra un control negativo con enzima sin ADN molde, en el carril 3 el control negativo sin enzima con ADN molde y en el carril 4 se encuentra la amplificación de Miraculin (573 pb).

5.2.3 Confirmación del inserto miraculin en la construcción CusF3H+_Miraculin

Para confirmar la presencia del inserto Miraculin en el plásmido pET30a(+)_CusF3H+ se realizó una PCR utilizando los oligonucleótidos específicos para Miraculin. Para esta PCR se utilizaron los ADNs plasmídicos que se obtuvieron a partir de las clonas resultantes de la transformación del producto de ligación. En el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular, en los carriles 2, 3 y 4 los ADNs plasmídicos analizados, el carril 5 corresponde al control negativo con enzima sin ADN molde y el carril 6 el control negativo sin enzima con ADN molde. Se puede observar que solo en los carriles 3 y 4 aparece una banda de amplificación muy cercana a los 600 pb, que es esperada ya que el peso de Miraculin es de 573 pb (Figura 11).

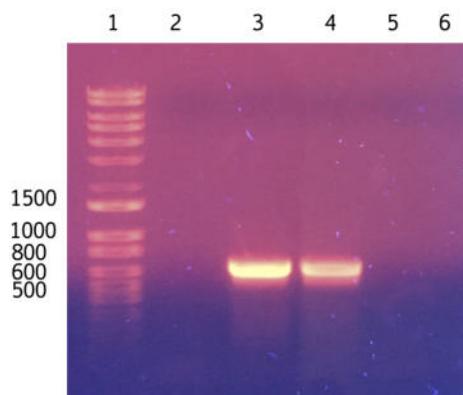


Figura 11. Productos de la PCR para la confirmación de la construcción CusF3H+_Miraculin en gel de agarosa al 0.7%. Carril 1: marcador de peso molecular, Carriles 2-4: ADNs plasmídicos analizados, carril 5: control negativo con enzima sin ADN molde y carril 6: control negativo sin enzima con ADN molde.

5.2.4 Confirmación del inserto Brazein en la construcción SmbP_Brazein

Para confirmar la presencia del inserto Brazein en el plásmido pET30a(+)_SmbP se realizó una PCR utilizando los oligonucleótidos T7. Para esta PCR se utilizaron los ADNs plasmídicos que se obtuvieron a partir de las clonas resultantes de la transformación del producto de ligación. En el carril 1 de la Figura 12 muestra el marcador de peso molecular, en los carriles 2 y 3 los ADNs plasmídicos analizados. Se puede observar que en ambos carriles aparece una banda de amplificación sobre los 600 pb, que representan el peso de SmbP_Brazein (453 pb) más los extremos amplificados por los iniciadores T7 (200 pb) un total de 653 pb.

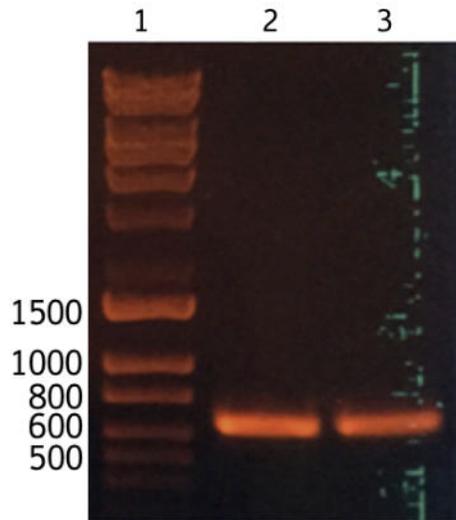


Figura 12. Productos de la PCR para la confirmación de la construcción SmbP_Brazzein (653 pb) en gel de agarosa al 0.7%. Carril 1: marcador de peso molecular, carriles 2 y 3: ADNs plasmídicos analizados.

5.3 Expresión de Proteínas

5.3.1 Microexpresión de CusF3H+_Brazzein y CusF3H+_Miraculin

Las microexpresiones se realizaron para seleccionar la colonia que expresaba mayor cantidad de proteína, para a partir de ella comenzar la expresión a 1 L o más. La Figura 13 representa las expresiones piloto para CusF3H+_Brazzein y CusF3H+_MCL. En el carril 1 se encuentra el marcador de peso molecular, en el carril 2 el control negativo que es la fracción soluble de *E. coli* SHuffle y en el carril 3 su fracción insoluble; en el carril 3 se muestra la fracción soluble de la expresión de la proteína de fusión CusF3H+; los carriles 5 y 7 corresponde a la fracción soluble de dos clonas de CusF3H+_Brazzein y en los carriles 6 y 8 las fracciones insolubles de esas mismas clonas; los carriles 9 y 11 muestran las fracciones soluble de dos clonas de CusF3H+_MCL y los carriles 10 y 12 las fracciones insolubles de esas mismas clonas. En el caso de CusF3H+_Brazzein (carriles 5-8) claramente se puede observar la aparición de nuevas bandas de proteína en comparación con las que comúnmente expresa la cepa *E. coli* SHuffle. Se logra visualizar que los carriles 5 y 7 son positivos para CusF3H+_Brazzein, mostrando la aparición de

una nueva banda cercana a los 20 kDa, lo que coincide con el peso de la proteína que es de aproximadamente 17.09 kDa. Además en los carriles 6 y 8 casi no se observa la aparición de la banda, lo que indica que no hay formación de cuerpos de inclusión o proteína insoluble. Por otro lado, para CusF3H+_MCL los carriles 9 y 11 muestran la aparición de una banda por encima de los 30 kDa la cual coincide con el peso de la proteína CusF3H+_MCL el cual aproximadamente es de 32.07 kDa. Así mismo se logra apreciar en los carriles 10 y 12 un poco de proteína insoluble en comparación con la proteína soluble expresada.

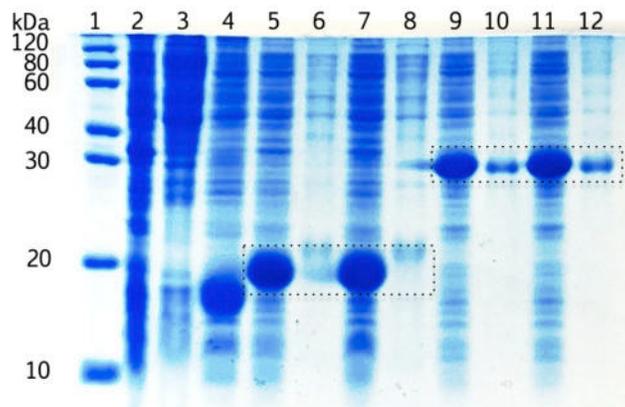


Figura 13. Expresiones en pequeña escala para CusF3H+_Brazzein (17.09 kDa) y CusF3H+_MCL (32.07 kDa) mediante SDS-PAGE al 15%. Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: fracción soluble *E. coli* SHuffle T7 express, carril 3: fracción insoluble *E. coli* SHuffle T7 express, carril 4: fracción soluble CusF3H+, carril 5 y 7: fracción soluble de CusF3H+_Brazzein, carril 6 y 8: fracción insoluble de CusF3H+_Brazzein, carril 9 y 11: fracción soluble CusF3H+_Miraculin y carril 10 y 12: fracción insoluble de CusF3H+_Miraculin.

5.4 Purificación de Proteínas

5.4.1 Cromatografía IMAC: CusF3H+_Brazzein

Se purificaron 30 mL del clarificado de proteína utilizando una columna HiTrap™ IMAC FF. En la Figura 14 se muestra el cromatograma de purificación por afinidad a Ni(II) de CusF3H+_Brazzein. Una vez que la muestra se unió a la resina de la columna, ésta fue lavada con 50 mM Tris, 500 mM NaCl pH 8 hasta que la absorbancia disminuyó,

posteriormente se realizó la elución con 50 mM Tris, 500 mM NaCl, 200 mM imidazol pH 8 en fracciones de 500 μ L cada una.

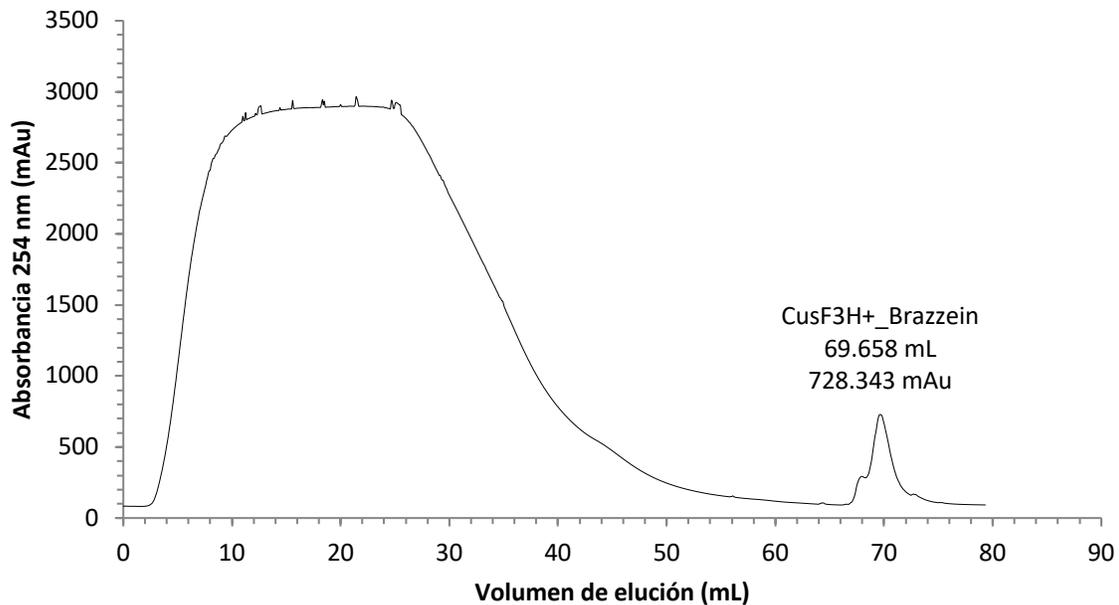


Figura 14. Cromatograma de purificación por afinidad a Ni(II) para CusF3H+_Brazzein. Solución amortiguadora de lisis y lavado: 50 mM Tris, 500 mM NaCl, solución amortiguadora de elución: 50 mM Tris, 500 mM NaCl, 200 mM imidazol pH 8. El pico de elución se obtuvo a los 69.658 mL de elución con una absorbancia de 728.343 mAu.

En la Figura 15 se observa el análisis de las fracciones de elución obtenidas. En el carril 1 se encuentra el marcador de peso molecular, seguido del lisado de *E. coli* en el carril 2, el percolado en el carril 3 y la fracción de lavado en el carril 4, a partir del carril 5-15 muestran las fracciones de elución obtenidas de la purificación. Como se puede observar la mayor cantidad de proteína purificada se encuentra en las primeras fracciones de la 8-15, resaltando las fracciones 10-12. Además, las bandas se encuentran cercanas a los 20 kDa lo que coincide con el peso molecular esperado que es de 17.09 kDa. En la misma Figura se puede observar la presencia de otras bandas de proteína que se pudieron unir a la resina pero que representan impurezas.

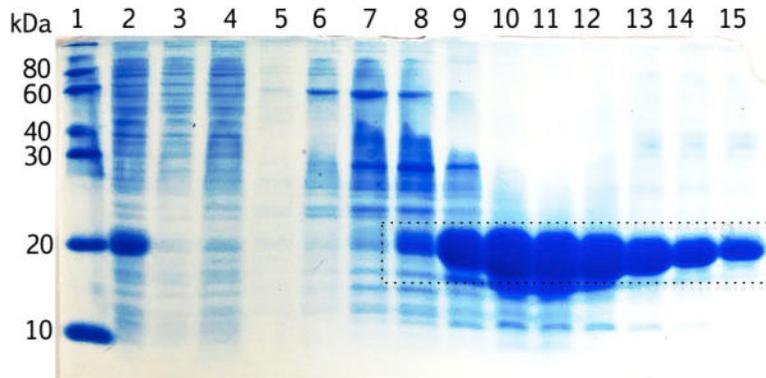


Figura 15. Análisis de fracciones de elución de CusF3H+_Brazzein (17.09 kDa) mediante SDS-PAGE 15%. Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: lisado, carril 3: percolado, carril 4: lavado, carriles 5-15: fracciones de elución.

Debido las impurezas de la purificación anterior se decidió realizar una nueva expresión y purificación de CusF3H+_Brazzein modificando las condiciones de lisis y lavado. La lisis se llevó a cabo utilizando 50 mM Tris, 500 mM NaCl, 5 mM imidazol pH 8, una vez cargada la muestra en la columna se lavó con 50 mM Tris, 500 mM NaCl, 10 mM imidazol pH 8 y finalmente se eluyó con 50 mM Tris, 500 mM NaCl, 200 mM imidazol pH 8. En la Figura 16 se muestra el cromatograma de purificación de esta proteína, observándose un pico de elución a los 77 mL con una absorbancia de 1011.621 mAu.

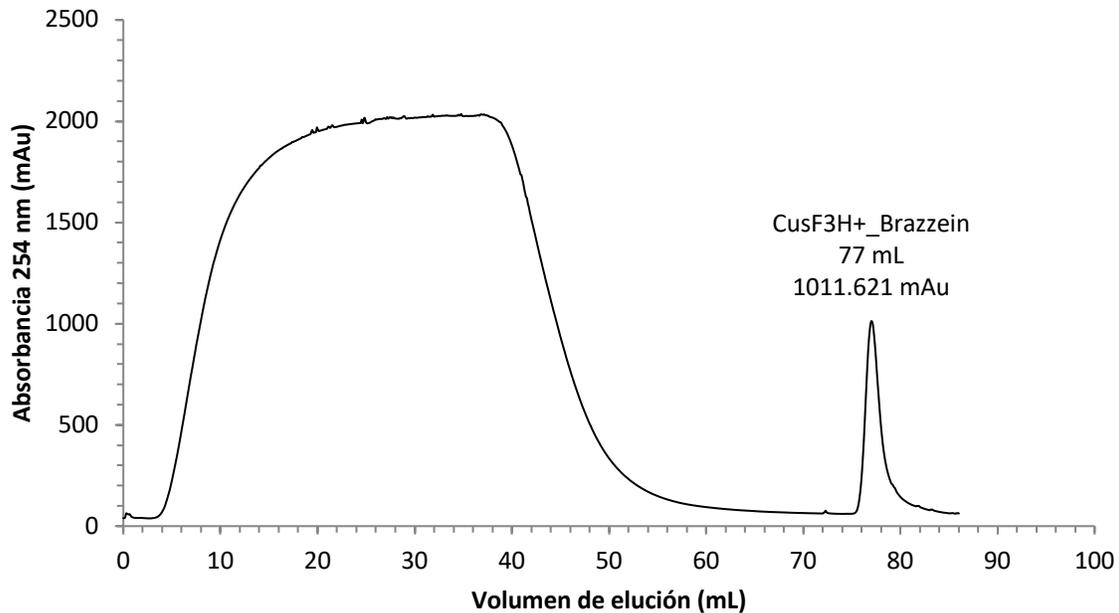


Figura 16. Cromatograma de purificación por afinidad a Ni(II) para CusF3H+_Brazzein. Solución amortiguadora de lisis: 50 mM Tris, 500 mM NaCl, 5 mM imidazol, solución amortiguadora de lavado: 50mM Tris, 500mM NaCl, 10mM imidazol y solución amortiguadora de elución: 50 mM Tris, 500 mM NaCl, 200 mM imidazol pH 8. El pico de elución se obtuvo a los 70 mL de elución con una absorbancia de 1011.621 mAu.

En la Figura 17 se observa el análisis de las fracciones de elución obtenidas. En los carriles 1 y 16 se encuentra el marcador de peso molecular, seguido del lisado de *E. coli* en el carril 2, el percolado en el carril 3, las fracciones de lavado en los carriles 4 y 5, a partir del carril 6-26 muestran las fracciones de elución obtenidas de la purificación. Como se puede observar la mayor cantidad de proteína purificada se encuentra en las primeras fracciones de la 8-14, sin embargo, se aprecian algunas bandas de impurezas. Por otro lado, en los carriles 15-26, aunque hay menos proteína, esta se observa más pura que las fracciones anteriores. Cabe mencionar que todas las bandas se encuentran cercanas a los 20 KDa lo que coincide con el peso molecular esperado que es de 17.09 KDa.

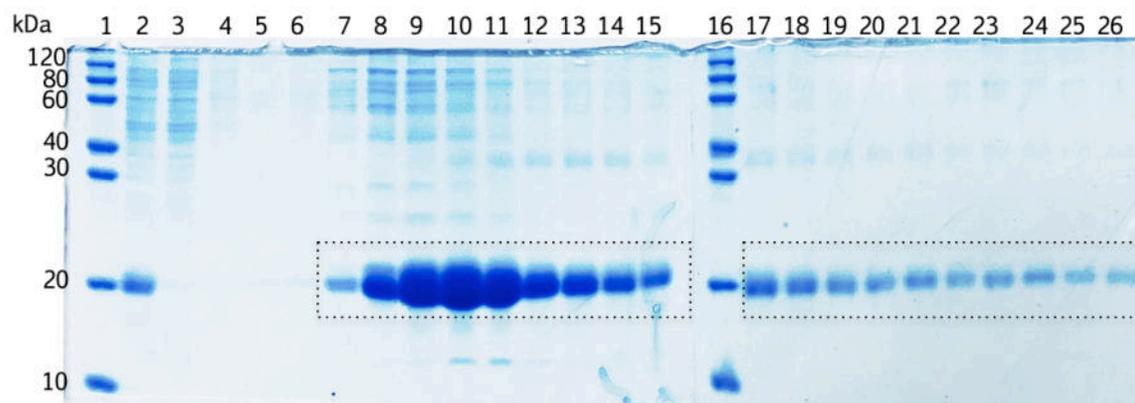


Figura 17. Análisis de fracciones de elución de CusF3H+_Brazzein (17.09 kDa) mediante SDS-PAGE 15%. Carriles 1 y 16: marcador de peso molecular, carril 2: lisado, carril 3: percolado, carriles 4 y 5: lavados, carriles 6-26: fracciones de elución.

5.4.2 Cromatografía por Intercambio Aniónico: CusF3H+_Brazzein

Para esta purificación se utilizaron las fracciones de elución que se obtuvieron de las purificaciones por afinidad a Ni(II). Previamente se dializaron para eliminar el imidazol y el NaCl presentes. Una vez terminada la diálisis la muestra se centrifugó a 10,000 rpm, 10 min a 4°C. Posteriormente se cargó en la columna HiTrap™ Q FF la cual había sido equilibrada con una solución amortiguadora de 50 mM Tris pH 8, la muestra se cargó en la columna y se aplicó un gradiente de elución de 0-100% con 1 M NaCl obteniendo el cromatograma que se muestra en la Figura 18. En donde se obtuvo un pico de elución a los 76.294 mL, a una concentración de 125 mM NaCl (12.5% 1 M NaCl) con una absorbancia de 577.092 mAu. Cuando la concentración de NaCl alcanzó el 100% (1 M) se obtuvo otro pico de elución a los 156.486 mL con una absorbancia de 85.511 mAu.

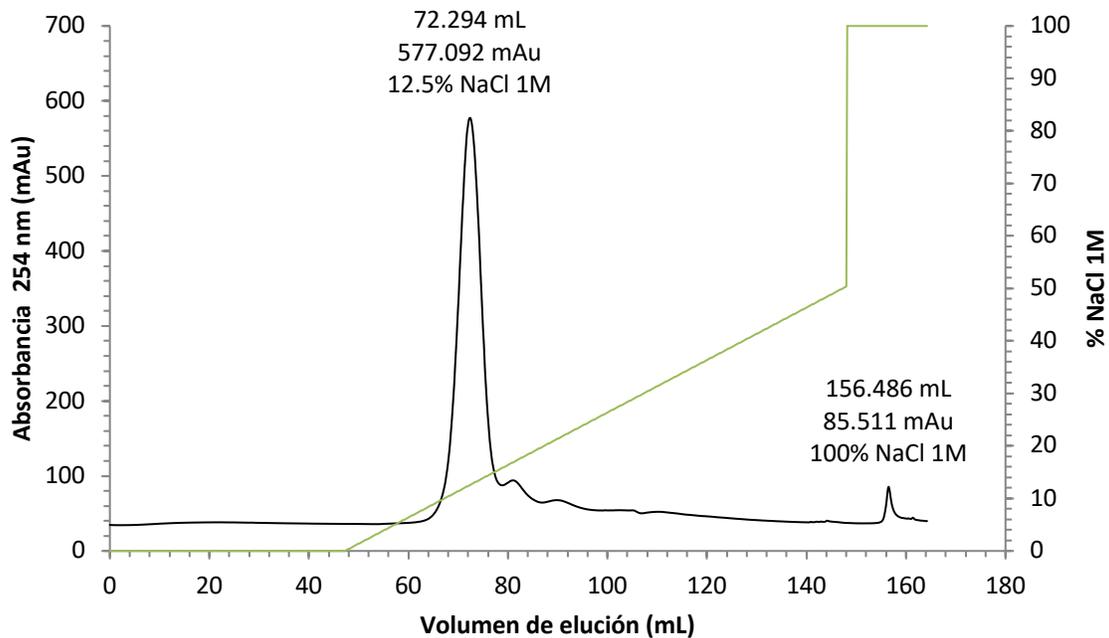


Figura 18. Cromatograma de purificación por Intercambio Aniónico con gradiente de elución para CusF3H+_Brazzein. Pico de elución 1: 76.294 mL, con concentración de 125 mM NaCl (12.5%) y absorbancia de 577.092 mAu. Pico de elución 2: 156.486 mL con concentración de 1 M NaCl (100%) y absorbancia de 85.511 mAu.

El análisis de las fracciones recolectadas del pico 1 se muestra en la Figura 19, en donde los carriles 1, 18 y 34 corresponden al marcador de peso molecular, los demás carriles corresponden a las fracciones de elución. Se puede observar que las fracciones 2-14 contienen mas proteína que las demás. En la misma imagen se puede observar que se disminuyeron considerablemente las impurezas o contaminantes proteínicos que se tenían después de la cromatografía por afinidad a Ni(II), aunque aún se observa una banda persistente cercana a los 70 kDa y 40 kDa.

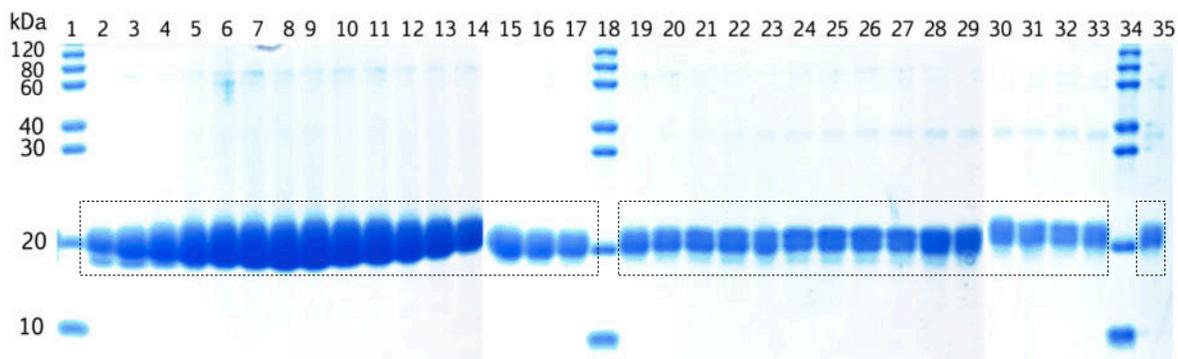


Figura 19. Análisis de fracciones de elución de CusF3H+_Brazzein (17.09 kDa) mediante SDS-PAGE 15%. Carriles 1, 18 y 34: marcador de peso molecular, carriles: 2-17, 19-33 y 35 fracciones de elución.

5.5 Cuantificación de Proteínas

5.5.1 Cuantificación de: CusF3H+_Brazzein

Para conocer la concentración de CusF3H+_Brazzein se realizó un ensayo de cuantificación de proteínas por el método Bradford. La Tabla 14 muestra las concentraciones de los estándares y la absorbancia registrada para cada uno de ellos.

Tabla 14. Datos de la curva de calibración para la cuantificación de proteínas por el método Bradford

Concentración	Absorbancia	Concentración	Absorbancia
0.1 mg/mL	0.402	0.6 mg/mL	0.6
0.2 mg/mL	0.447	0.8 mg/mL	0.649
0.4 mg/mL	0.533	1 mg/mL	0.69

La Figura inferior (Figura 20) muestra la curva de calibración obtenida a partir de las mediciones de absorbancia de los estándares de BSA. Utilizando la ecuación de la recta se obtuvo una concentración de 0.88 mg/mL de CusF3H+_Brazzein. Tomando en cuenta esta concentración y multiplicando por los 20 mL de proteína obtenida de la purificación por Intercambio Aniónico se obtuvo un total de 17.55 mg/L de CusF3H+_Brazzein.

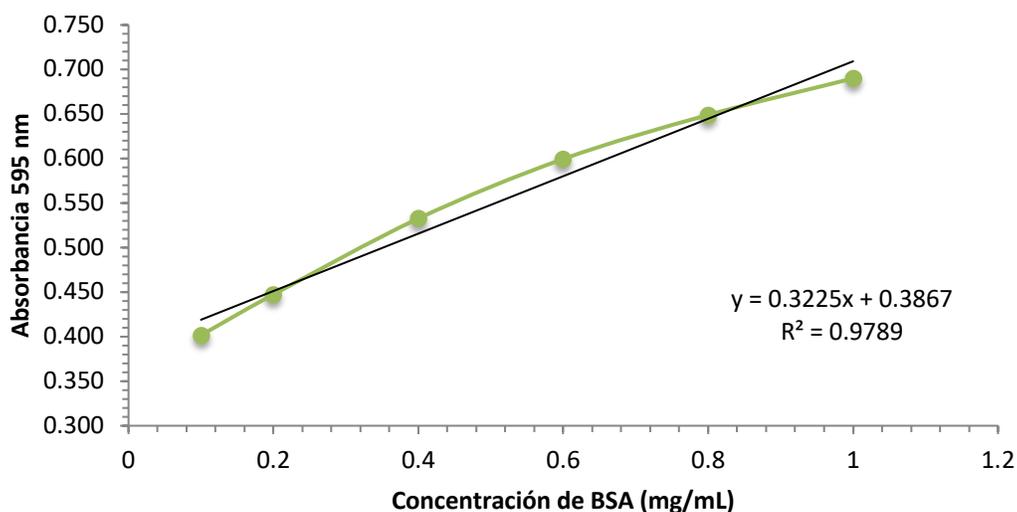


Figura 20. Curva de calibración de BSA para la cuantificación de CusF3H+_Brazzein

5.6 Remoción del tag

Para eliminar la proteína de fusión, se llevó a cabo la reacción con enteroquinasa. En la Figura 21 se observa la digestión de CusF3H+_Brazzein a diferentes tiempos de exposición. En el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular, el carril 2: CusF3H+_Brazzein sin digerir y los carriles 3-6 muestran la reacción a las 2, 4, 6 y 24 horas respectivamente. Se puede observar que a partir de las 3 horas comienza la aparición de una banda mayor a los 10 kDa que corresponde a la proteína de fusión CusF3H+, sin embargo, no se logra visualizar la banda que corresponde a Brazzein (6.37 kDa). Cabe mencionar que aún cuando han transcurrido 24 horas de reacción, no se logra una digestión completa.

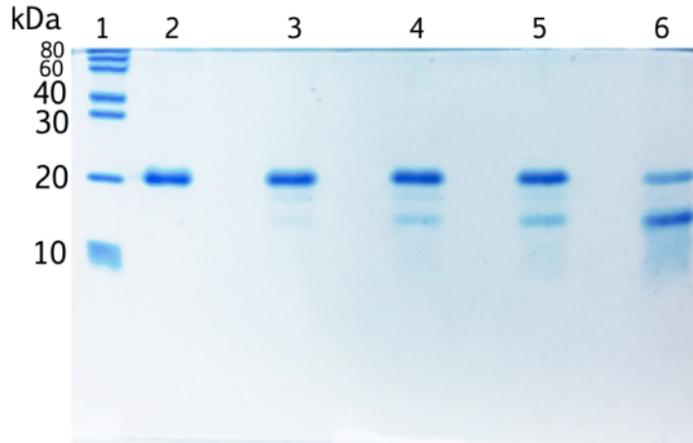


Figura 21. Análisis de digestión a 25°C con la enzima enteroquinasa para CusF3H+_Brazzein mediante SDS-PAGE 18%. Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: CusF3H+_Brazzein sin digerir, carril 3: 2 horas de digestión, carril 4: 4 horas de digestión, carril 5: 6 horas de digestión y carril 6: 24 horas de digestión.

El experimento se repitió varias veces, aumentando la concentración de enteroquinasa y el tiempo de reacción, sin embargo no se completaba la reacción

5.7 Microexpresión de SmbP_Brazzein

La Figura 22 representa las microexpresiones de SmbP_Brazzein. En el carril 1 se encuentra el marcador de peso molecular, en el carril 2 el control negativo que es la fracción soluble de *E. coli* SHuffle T7 express y en el carril 3 su fracción insoluble; en los carriles 4, 6 y 8 se colocaron las fracciones solubles de 3 clonas diferentes de SmbP_Brazzein y en los carriles 5, 7 y 9 sus fracciones insolubles. Se logra visualizar que los carriles 4, 6 y 8 son positivos para SmbP_Brazzein, mostrando la aparición de una nueva banda cercana a los 20 kDa, lo que coincide con el peso de la proteína que es de aproximadamente 16.8 kDa. Además, en los carriles 6, 7 y 9 no se observa la aparición de la banda, lo que indica que no hay formación de cuerpos de inclusión o proteína insoluble.

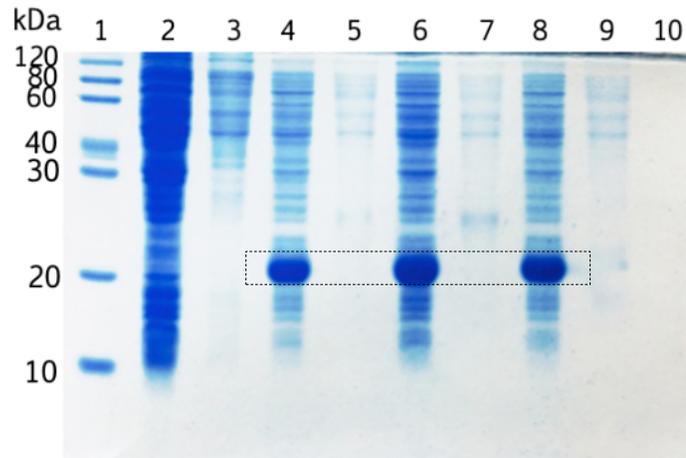


Figura 22. Expresiones en pequeña escala para SmbP_Brazzein (16.8 kDa) mediante SDS-PAGE al 15%. Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: fracción soluble *E. coli* SHuffle T7 express, carril 3: fracción insoluble *E. coli* SHuffle T7 express, carriles 4, 6 y 8: fracción soluble SmbP_Brazzein, carril 5, 7 y 9: fracción insoluble de SmbP_Brazzein.

5.8 Purificación SmbP_Brazzein: IMAC

Se purificaron 30 mL del clarificado de proteína utilizando una columna HiTrap™ IMAC FF, la muestra se encontraba en 50 mM Tris, 500 mM NaCl, 5 mM imidazol, pH 8. En la Figura 23 se muestra el cromatograma de purificación por afinidad a Ni(II) de SmbP_Brazzein. Una vez que la muestra se unió a la resina de la columna, ésta fue lavada con 50 mM Tris, 500 mM NaCl, 10 mM imidazol pH 8 hasta que la absorbancia disminuyó, posteriormente se realizó la elución con gradiente (0-100%) con 50 mM Tris, 500 mM NaCl, 200 mM imidazol pH 8 en fracciones de 1 mL cada una.

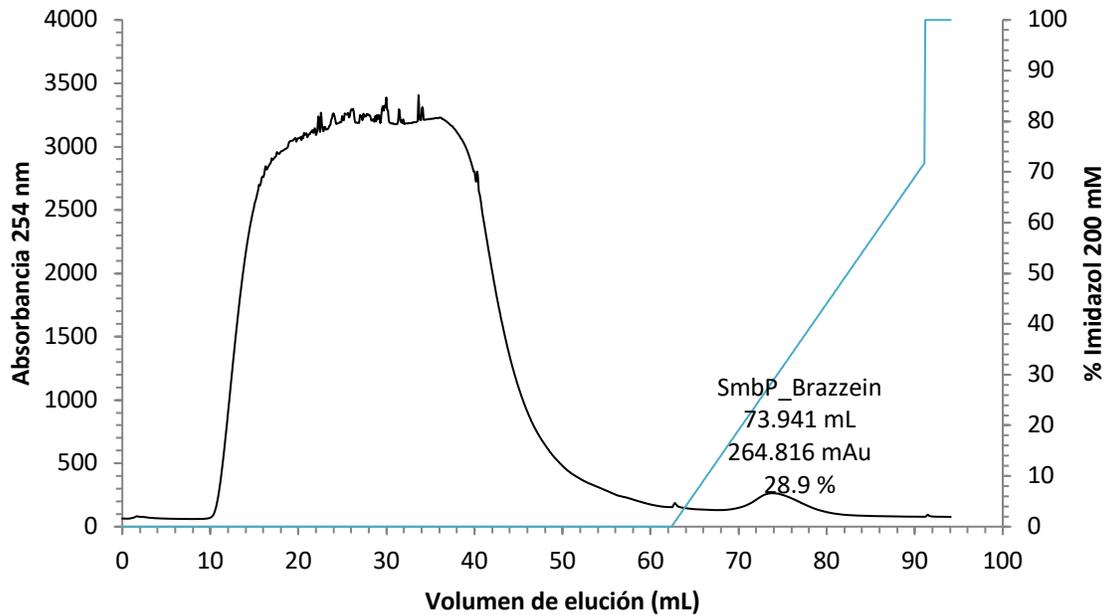


Figura 23. Cromatograma de purificación por afinidad a Ni(II) para SmbP_Brazzein con gradiente de elución. Solución amortiguadora de lisis: 50 mM Tris, 500 mM NaCl, 5 mM imidazol, solución amortiguadora de lavado: 50mM Tris, 500mM NaCl, 10mM imidazol y solución amortiguadora de elución: 50 mM Tris, 500 mM NaCl, 200 mM imidazol pH 8. El pico de elución más alto se obtuvo a los 73.9 mL de elución con una absorbancia de 264.81.621 mAu

En la Figura 24 se observa el análisis de las fracciones de elución obtenidas. En los carriles 1 y 11 se encuentra el marcador de peso molecular, seguido del lisado de *E. coli* en el carril 2, el percolado en el carril 3 y una fracción de lavado en el carril 4, a partir del carril 6 – 26 muestran las fracciones de elución obtenidas de la purificación. Como se puede observar las fracciones más puras se encuentran en los carriles 5 – 13, en los carriles 14 – 20 hay mucha proteína sin embargo se aprecian algunas bandas de impurezas. Cabe mencionar que todas las bandas se encuentran cercanas a los 20 kDa lo que coincide con el peso molecular esperado que es de 16.8 kDa.

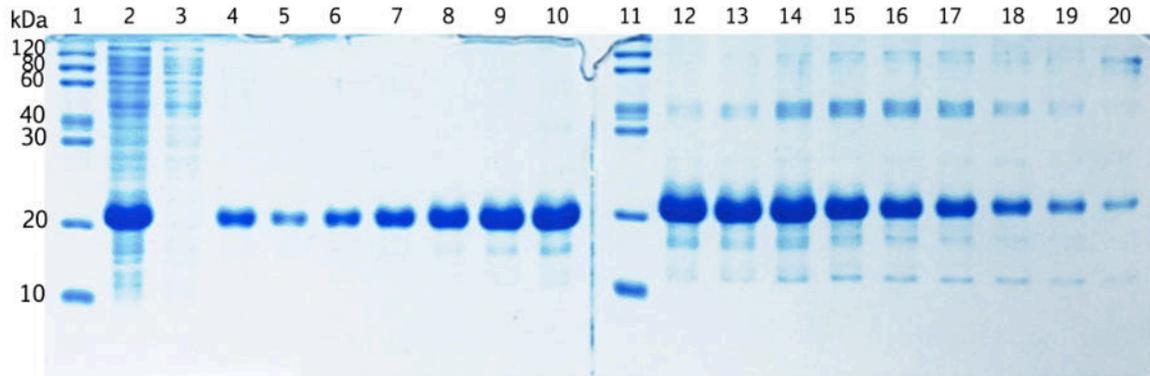


Figura 24. Análisis de fracciones de elución de SmbP_Brazzein (16.8 kDa) mediante SDS-PAGE 15%. Carriles 1 y 11: marcador de peso molecular, carril 2: lisado, carril 3: percolado, carriles 4: lavado 5-10 y 12-20: fracciones de elución

Las 16 fracciones anteriores se dializaron con 50 mM Tris, pH 8 se cuantificaron mediante el método de Bradford, de las cuales se obtuvo una concentración de 0.410 mg/mL dando un total de 6.56 mg/L de SmbP_Brazzein.

5.9 Digestión con enteroquinasa y remoción del tag

Se tomaron 2 mg de SmbP_Brazzein y se digirieron con enteroquinasa (1 μ L de enteroquinasa por cada 400 μ g de proteína). Y se llevó a cabo la remoción de la proteína de fusión usando dos métodos, por cromatografía por exclusión por tamaño y cromatografía por intercambio aniónico.

En la Figura 25 se muestra el cromatograma de purificación por exclusión por tamaño (SEC) utilizando la columna Superdex 200 Increase 10/300 GL a una presión de 1.10 MPa con un flujo de 0.3 mL/min y se recolectaron fracciones de 200 μ L. De la purificación se obtuvieron 7 picos de elución los cuales fueron analizados por SDS-PAGE 16%.

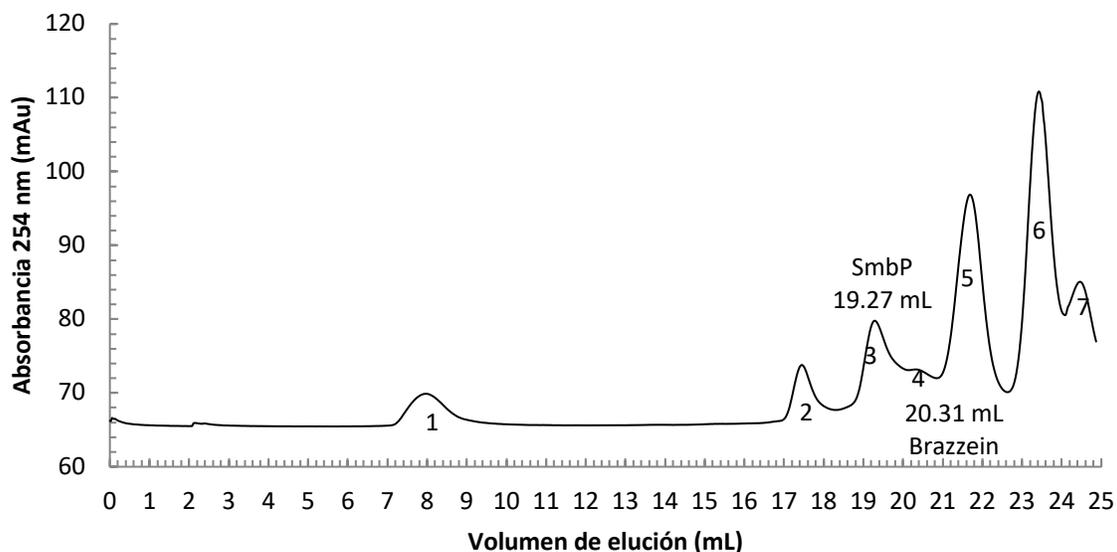


Figura 25. Cromatograma de purificación por exclusión por tamaño de SmbP y Brazzein después de digestión con enteroquinasa. El pico 3 eluyó a los 19.27 mL y el pico 4 a los 20.31 mL.

En la Figura 26 se observan los resultados de los picos de elución 3 y 4. En el carril 1 aparece el marcador de peso molecular, en el carril 2 SmbP_Brazzein después de la digestión con enteroquinasa, por lo que se pueden observar dos bandas que representan a SmbP (9.8 kDa) y a Brazzein (6.37 kDa). En los carriles 3 y 4 se cargaron las muestras correspondientes al pico de elución 3 y se observa una banda sobre los 10 kDa que representa a SmbP; en los carriles 5 – 7 se cargaron las muestras del pico 4 y se observa una banda menor a los 10 kDa que corresponde a Brazzein.

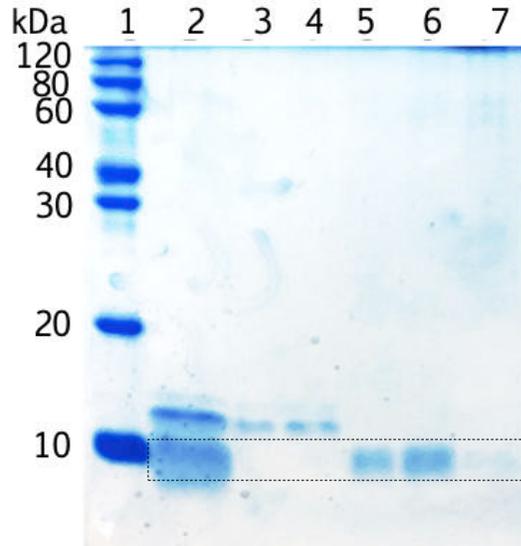


Figura 26. Análisis de fracciones de elución por exclusión por tamaño de SmbP (9.8 kDa) y Brazzein (6.37 kDa) mediante SDS-PAGE 16%. Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: SmbP_Brazzein después de digestión con enteroquinasa, carriles 3 y 4: fracciones de elución de SmbP y carriles 5-7: fracciones de elución de Brazzein.

Para la cromatografía por intercambio aniónico se utilizó la columna HiTrap™ Q FF la cual había sido equilibrada con una solución amortiguadora de 50 mM Tris pH 8, la muestra se cargó en la columna y se aplicó un gradiente de elución de 0-100% con 1 M NaCl obteniendo el cromatograma que se muestra en la Figura 27. En donde se obtuvieron dos picos de elución, el primero a los a los 42.54 mL, a una concentración de 312 mM NaCl (31.2% 1 M NaCl) con una absorbancia de 52.67 mAu. El segundo pico de elución se obtuvo a los 44.7 mL, a una concentración de 365 mM NaCl (36.5% 1M NaCl) y una absorbancia de 100.38 mAU.

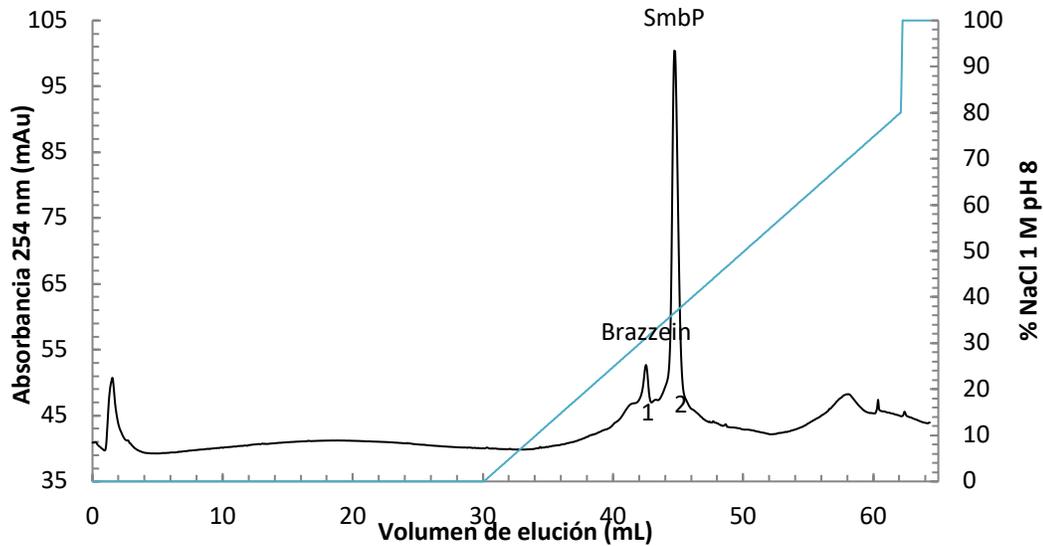


Figura 27. Cromatograma de purificación por intercambio aniónico para SmbP + Brazzein después de digerir con enteroquinasa. Buffer de equilibrio: 50 mM Tris, pH 8, y buffer de elución: 50 mM Tris, 1 M NaCl, pH 8. El pico de elución de Brazzein se obtuvo a los 42.54 mL de elución con una absorbancia de 52.67 mAu y una concentración de 312 mM de NaCl (31.2%).

El análisis de las fracciones recolectadas de los picos 1 y 2 se muestra en la Figura 28, en donde los carriles 1 y 16 corresponden al marcador de peso molecular, en el carril 2 se observa SmbP_Brazzein después de la digestión con enteroquinasa y en los carriles 3 – 15 y 17 – 30 las fracciones de elución. Se puede observar que a partir de la fracción 12 – 20 aparece una banda cercana a los 10 kDa que corresponde a Brazzein (6.37 kDa) y de las fracciones 23-30 se observa una banda sobre los 10 kDa que corresponde a la proteína de fusión SmbP.

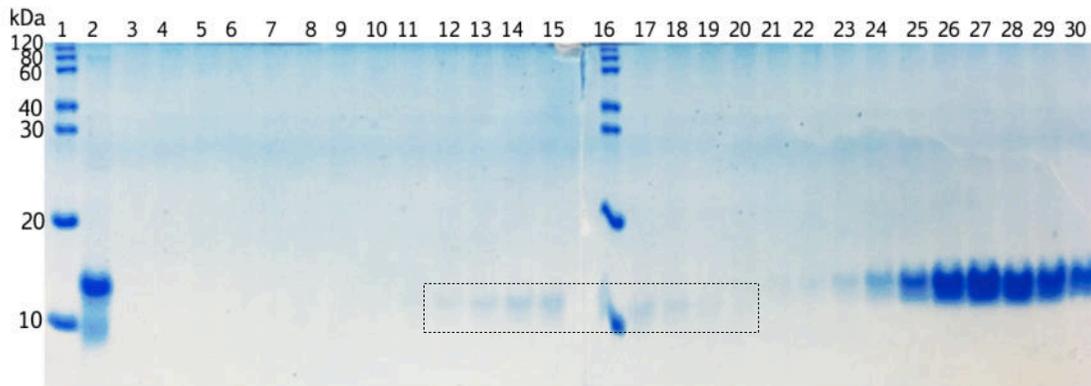


Figura 28. Análisis de fracciones de elución de la separación de SmbP (9.8 kDa) + Brazzein (6.37 kDa) por IA mediante SDS-PAGE 15%. Carriles 1 y 16: marcador de peso molecular, carril 2: Digestión de SmbP_Brazzein con enteroquinasa, carriles 12-20: fracciones de elución de Brazzein, carriles 23-30: fracciones de elución de SmbP.

5.10 Evaluación de la actividad

Para la evaluación de la actividad se recolectaron las fracciones de Brazzein y se dializaron con agua. Se cuantificaron con el método BCA y se obtuvo una concentración de 0.147 mg/mL. La actividad la evaluaron 5 individuos tomando 200 μ L de una solución de sacarosa al 1% para determinar si percibían la dulzura, una vez que la percibieron, se enjugaron la boca con agua y posteriormente se colocaron 200 μ L de la proteína, y aunque no se detectó dulzura similar a la de la sacarosa, se percibió un sabor diferente más no dulce.

5.11 Purificación de proteínas

5.11.1 Cromatografía IMAC: CusF3H+_MCL

Se purificaron 30 mL del clarificado de proteína utilizando una columna HiTrap™ IMAC FF. En la Figura 29 se muestra el cromatograma de purificación por afinidad a Ni(I) de CusF3H+_MCL. Una vez que la muestra se unió a la resina de la columna, ésta fue lavada con 50 mM Tris, 500 mM NaCl pH 8 hasta que la absorbancia disminuyó,

posteriormente se realizó la elución con 50 mM Tris, 500 mM NaCl, 200 mM imidazol pH 8 en fracciones de 500 μ L cada una.

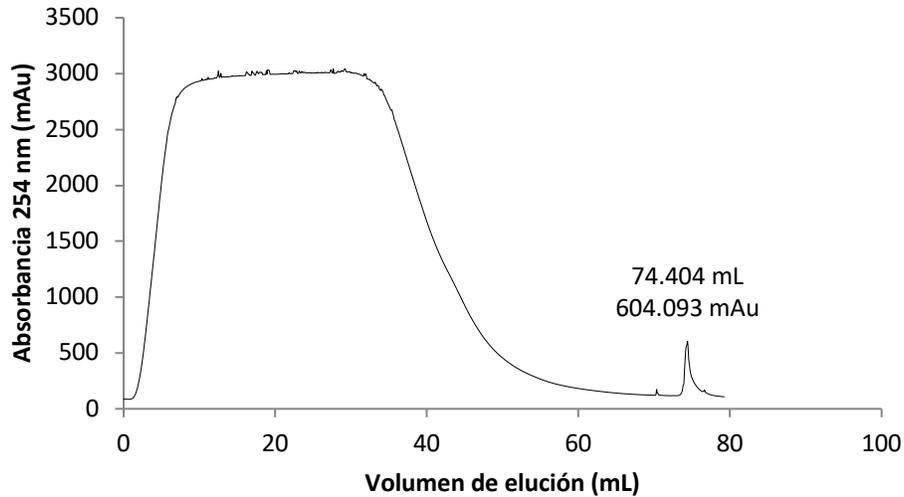


Figura 29. Cromatograma de purificación por afinidad a Ni (II) para CusF3H+_MCL. Solución amortiguadora de lisis y lavado: 50 mM Tris, 500 mM NaCl, solución amortiguadora de elución: 50 mM Tris, 500 mM NaCl, 200 mM imidazol pH 8. El pico de elución se obtuvo a los 74.40 mL de elución con una absorbancia de 604.09 mAu

En la Figura 30 se observa el análisis de las fracciones de elución obtenidas. En el carril 1 se encuentra el marcador de peso molecular, seguido del lisado de *E. coli* en el carril 2, el percolado en el carril 3 y la fracción de lavado en el carril 4, a partir del carril 5 – 15 muestran las fracciones de elución obtenidas de la purificación. Como se puede observar no hay presencia de la banda de CusF3H+_MCL (32.07 kDa) en ninguno de los carriles.

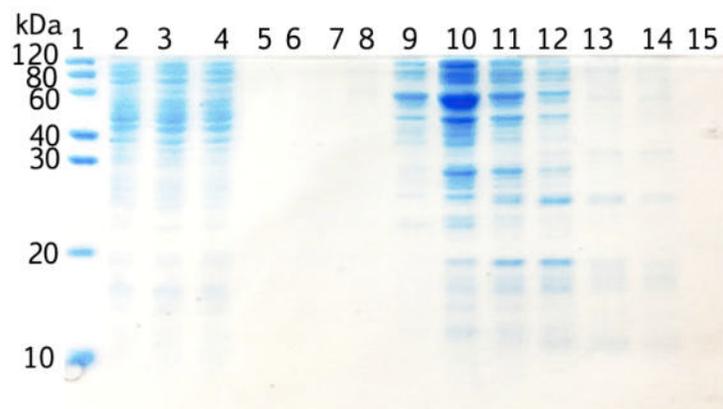


Figura 30. Análisis de fracciones de elución de CusF3H+_MCL (32.07 kDa) mediante SDS-PAGE 15%. Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: lisado, carril 3: percolado, carril 4: lavado, carriles 5-15: fracciones de elución.

De los resultados anteriores se analizó por SDS-PAGE el residuo celular y fue ahí donde se visualizó la banda de CusF3H+_MCL.

5.12 Solubilización de CusF3H+_MCL

5.12.1 Tratamiento con lisozima y lisozima/triton X-100 y lisis celular

Se expresaron 500 mL de CusF3H+_MCL y se recolectó el sedimento celular el cual se resuspendió en 50 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 8 y se trató con lisozima (0.3 mg/mL) y se incubó por 3 horas a 4°C y posteriormente se lisó con perlas de vidrio. Al finalizar, una fracción se incubó con triton X-100 1%, en cada paso del proceso se tomaron muestras tanto del clarificado como del residuo celular y se analizaron por SDS-PAGE. En la Figura 31 se observan los resultados de este tratamiento, en donde el carril 1 corresponde al marcador de peso molecular, en el carril 2 el clarificado del tratamiento con lisozima, en el carril 3 el residuo celular del tratamiento con lisozima; en el carril 4 el clarificado del tratamiento con lisozima después de la lisis celular, en el carril 5 el residuo celular del tratamiento con lisozima después de la lisis celular; en el carril 7 el clarificado del tratamiento con lisozima y triton, en el carril 8 el residuo celular del tratamiento con lisozima y triton; en el carril 9 el clarificado del tratamiento con

lisozima, lisis celular y triton y finalmente en el carril 10 el residuo celular del tratamiento con lisozima, lisis celular y triton. Se puede observar que en los carriles 3, 5, 8 y 10 se observa la banda de CusF3H+_MCL, sin embargo todos estos carriles corresponden al residuo celular y no a la fracción soluble.

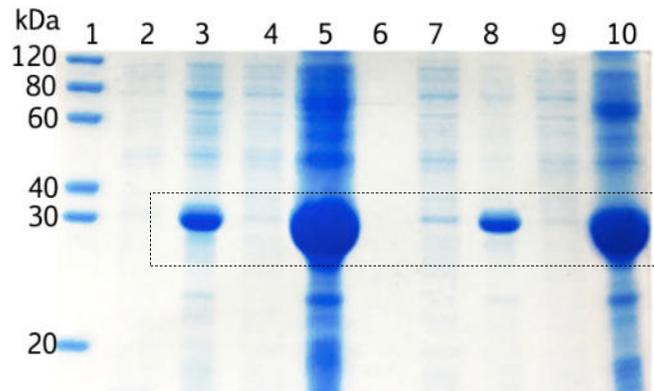


Figura 31. Análisis de fracciones del tratamiento con lisozima, lisozima/triton y lisis celular para CusF3H+_MCL (32.07 kDa) por SDS-PAGE 15%. Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: clarificado del tratamiento con lisozima, carril 3: residuo celular del tratamiento con lisozima, carril 4: clarificado del tratamiento con lisozima después de la lisis celular, carril 5: residuo celular del tratamiento con lisozima después de la lisis celular, carril 7: clarificado del tratamiento con lisozima y triton, carril 8: residuo celular del tratamiento con lisozima y triton, carril 9: clarificado del tratamiento con lisozima, lisis celular y triton, carril 10: residuo celular del tratamiento con lisozima, lisis celular y triton.

5.12.2 Tratamiento con NaCl y triton X-100

Se expresaron 500 mL de CusF3H+_MCL, se recolectó el sedimento celular y se resuspendió en 50 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 8, posteriormente se lisó con perlas de vidrio. Después de la lisis, la muestra se centrifugó y se recolectó el clarificado y el residuo celular. El residuo celular se resuspendió en 18 mL de 50 mM Tris, 1 M NaCl, pH 8 (CRC), se incubó a 4 °C por 30 minutos con agitación (RC1) y después se agregaron 2 mL de triton X-100 al 10%, la adición de triton X-100 y NaCl 1M se continuó cada 30 minutos por 2 horas muestreando entre cada adición, finalmente la muestra se dejó

incubar durante toda la noche. Todas las muestras recolectadas se centrifugaron y se analizó su residuo celular y el clarificado.

En la Figura 32 se observan los resultados de estos tratamientos descritos en la Tabla 15. De los resultados de este experimento se puede observar que en los carriles 4, 6, 8, 10 y 12 se observa la presencia de CusF3H+_MCL (32.07 kDa) sin embargo, al igual que en el tratamiento anterior, todos estos carriles corresponden al residuo celular y no a la fracción soluble.

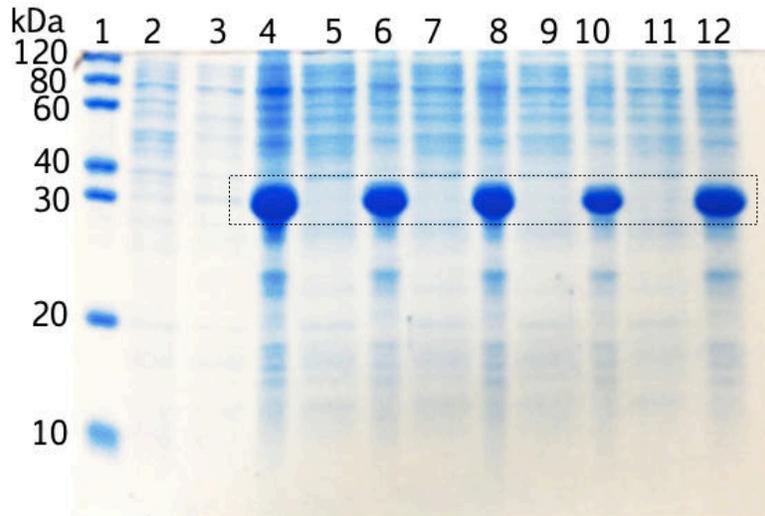


Figura 32. Análisis de fracciones del tratamiento con NaCl/Triton X-100 para CusF3H+_MCL (32.07 kDa) por SDS-PAGE 15%. Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: clarificado después de la lisis celular, carril 3: clarificado del tratamiento con 50 mM Tris, 1M NaCl, carril 4: residuo celular del tratamiento con 50 mM Tris, 1M NaCl, carril 5: clarificado del tratamiento con 50 mM Tris, 1M NaCl, 1% triton X-100, carril 6: residuo celular del tratamiento con 50 mM Tris, 1M NaCl, 1% triton X-100, carril 7: clarificado del tratamiento con 50 mM Tris, 1M NaCl, 1.8% triton X-100, carril 8: residuo celular del tratamiento con 50 mM Tris, 1M NaCl, 1.8% triton X-100, carril 9: clarificado del tratamiento con 50 mM Tris, 1M NaCl, 2.1% triton X-100, carril 10: residuo celular del tratamiento con 50 mM Tris, 1M NaCl, 2.1% triton X-100, carril 11: clarificado del tratamiento con 50 mM Tris, 1M NaCl, 2.1% triton X-100 por toda la noche, carril 12: residuo celular del tratamiento con 50 mM Tris, 1M NaCl, 2.1% triton X-100 por toda la noche.

Tabla 15. Condiciones del tratamiento para CusF3H+_MCL con triton X-100 y NaCl.

Carril	Tratamiento
1	Marcador de peso molecular
2	Clarificado
3	Clarificado del tratamiento con 50 mM TRIS, 1M NaCl
4	Residuo celular del tratamiento con 50 mM TRIS, 1M NaCl
5	Clarificado del tratamiento con 50 mM TRIS, 1M NaCl, 1% triton X-100
6	Residuo celular del tratamiento con 50 mM TRIS, 1M NaCl, 1% triton X-100
7	Clarificado del tratamiento con 50 mM TRIS, 1M NaCl, 1.8% triton X-100
8	Residuo del tratamiento con 50 mM TRIS, 1M NaCl, 1.8% triton X-100
9	Clarificado del tratamiento con 50 mM TRIS, 1M NaCl, 2.1% triton X-100
10	Residuo del tratamiento con 50 mM TRIS, 1M NaCl, 2.1% triton X-100
11	Clarificado del tratamiento con 50 mM TRIS, 1M NaCl, 2.1% triton X-100 por toda la noche
12	Residuo del tratamiento con 50 mM TRIS, 1M NaCl, 2.1% triton X-100 por toda la noche

Nota: Clarificado se refiere al sobrenadante obtenido del tratamiento, por residuo se refiere al pellet celular resultante del tratamiento

5.12.3 Extracción por congelación/descongelación y detergentes iónicos

Para esta extracción se expresaron 500 mL de CusF3H+_MCL. Se recolectó el sedimento celular y se resuspendió en 50 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 8. Después se congeló con una mezcla de CO₂/Metanol y rápidamente se descongeló en un baño de agua a 37 °C. El proceso se repitió 7 veces. Después se agregaron los detergentes CHAPS ((3-Colamidopropil) Dimetilamonio)-1-Propanosulfonato) al 1%, sarcosil al 0.3% y betamercaptoetanol (BME) 1 mM en todas las posibles combinaciones y se incubaron a 4 °C por 1 hora, 4 °C por 24 horas, 25 °C por 1 hora y 25 °C por 24 horas. Al pasar el tiempo de incubación, las muestras se centrifugaron y se colectó el clarificado para su análisis. En la Figura 33 se puede observar el análisis por SDS-PAGE 15% de todas las combinaciones a 4 °C, sin embargo no se logra observar la presencia de CusF3H+_MCL (32.07 kDa). Cabe mencionar que se obtuvieron los mismos resultados a 25 °C.

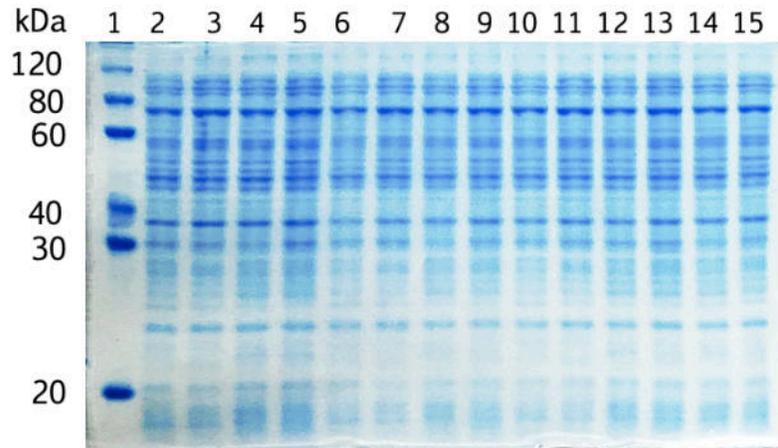


Figura 33. Análisis de fracciones del tratamiento por congelación/descongelación y detergentes iónicos a 4°C. Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: 0.1% CHAPS 1 hora, carril 3: 0.1% CHAPS 24 horas, carril 4: 0.3% sarcosil 1 hora, carril 5: 0.3% sarcosil 24 horas, carril 6: 1 mM BME 1 hora, carril 7: 1mM BME 24 horas, carril 8: 0.1% CHAPS + 0.3% sarcosil 1 hora, carril 9: 0.1% CHAPS + 0.3% sarcosil 24 horas, carril 10: 0.1% CHAPS + 1 mM BME 1 hora, carril 11: 0.1% CHAPS + 1 mM BME 24 horas, carril 12: 0.3% sarcosil + 1 mM BME 1 hora, carril 13: 0.3 sarcosil + 1 mM BME 24 horas, carril 14: 0.1% CHAPS + 0.3% sarcosil + 1 mM BME 1 hora, carril 15: 0.1% CHAPS + 0.3% sarcosil + 1 mM BME 24 horas.

Todos los tratamientos para solubilizar CusF3H+_MCL se llevaron a cabo también para SmbP_MCL, obteniendo los mismos resultados. En los cuales la proteína permaneció en el residuo celular.

5.13 Expresión de CusF3H+_MCL en *E. coli* Origami2(DE3)

Se expresaron 500 mL de CusF3H+_MCL en la cepa *E. coli* Origami2(DE3). El sedimento celular se resuspendió en 30 mL de la solución amortiguadora de unión, se agregaron 0.2 mg/mL de lisozima y se incubó por 1 hora a 4 °C y se lisaron con perlas de vidrio a 4 °C por 16 ciclos de 1 minuto; entre cada ciclo, la muestra se mantenía en hielo. El clarificado obtenido se purificó por IMAC y las fracciones obtenidas se analizaron por SDS-PAGE 12% (Figura 34). En el carril 1 se encuentra el marcador de peso molecular, en el carril 2 el clarificado de CusF3H+_MCL, en el carril 3 los restos celulares, en el carril

4 el percolado, en el carril 5 el lavado y en los carriles 6 – 10 las fracciones de elución de CusF3H+_MCL. Se puede observar que incluso en esta cepa, añadiendo lisozima y aumentando el tiempo de lisis, la proteína permanece en los restos celulares.

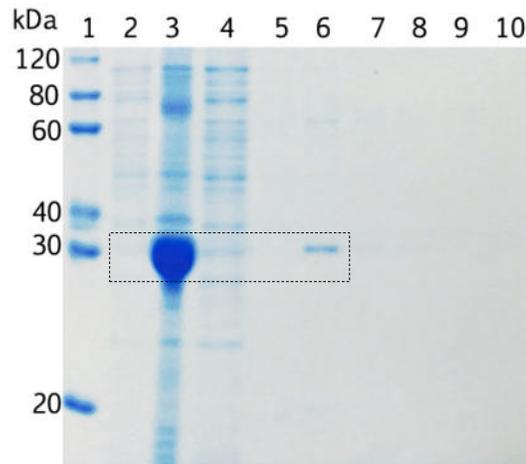


Figura 34. Purificación de CusF3H+_MCL (32.07 kDa) expresada en Origami2(DE3) mediante SDS-PAGE al 12%. Carril 1: Marcador de peso molecular, carril 2: Clarificado, carril 3: Restos celulares después de lisis con perlas de vidrio y lisozima, carril 4: percolado, carril 5: fracción de lavado, carril 6-10: fracciones de elución de CusF3H+_MCL.

5.14 Expresión en NativeFolder™

Para la expresión en el medio NativeFolder™ se prepararon 30 mL del medio y se inocularon con células de *E. coli* SHuffle transformadas con CusF3H+_MCL y SmbP_MCL. Se llevó a cabo la expresión a 20 °C por 16 horas y se analizó 1 mL de la expresión. La Figura 35 muestra los resultados de esta expresión, en la que el carril 2 muestra el marcador de peso molecular, el carril 3 SmbP_MCL antes de la inducción, el carril 4 SmbP_MCL después de la inducción, el carril 5 CusF3H+_MCL antes de la inducción, el carril 6 CusF3H+_MCL después de la inducción. Estas muestras se prepararon mediante calentamiento a 95 °C por 5 minutos. Las muestras de los carriles 8 y 9 se lisaron con perlas de vidrio, en el carril 8 se encuentra SmbP_MCL después de la inducción y en el carril 9 CusF3H+_MCL después de la inducción. Se puede observar la aparición de una

banda entre los 25 y 35 kDa que corresponde a SmbP_MCL (31.72 kDa) y CusF3H+_MCL (32.07 kDa). Esto significa que en este medio de cultivo es posible obtener SmbP_MCL y/o CusF3H+_MCL en la fracción soluble. Posteriormente el proceso se escaló a 500 mL.

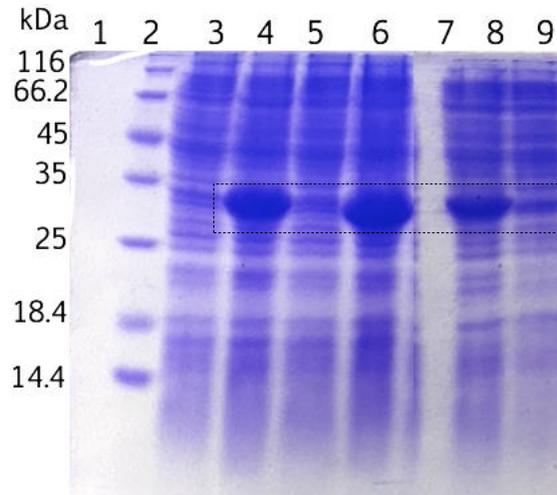


Figura 35. Análisis de microexpresión de SmbP_MCL(31.72 kDa) y CusF3H+_MCL (32.07 kDa) en medio Native Folder mediante SDS-PAGE 15%. Carril 2: marcador de peso molecular, carril 3: SmbP_MCL antes de la inducción con calentamiento a 95°C, carril 4: SmbP_MCL después de la inducción con calentamiento a 95°C, carril 5: CusF3H+_MCL antes de la inducción con calentamiento a 95°C, carril 6: CusF3H+_MCL después de la inducción con calentamiento a 95°C, carril 8: SmbP_MCL después de la inducción por lisis con perlas de vidrio, carril 9: CusF3H+_MCL después de la inducción por lisis con perlas de vidrio.

5.15 Purificación de SmbP_MCL expresada en Native Folder™

5.15.1 Purificación IMAC

Se purificaron 30 mL del clarificado de proteína utilizando una columna HiTrap™ IMAC FF. En la Figura 36 se muestra el cromatograma de purificación por afinidad a Ni(II) de SmbP_MCL. Una vez que la muestra se unió a la resina de la columna, ésta fue lavada con el buffer de unión (50 mM Tris, 500 mM NaCl, 5 mM imidazol, pH 8) hasta que la

absorbancia disminuyó, posteriormente se realizó la elución en un solo paso con 50 mM Tris, 500 mM NaCl, 200 mM imidazol pH 8 en fracciones de 1 mL cada una.

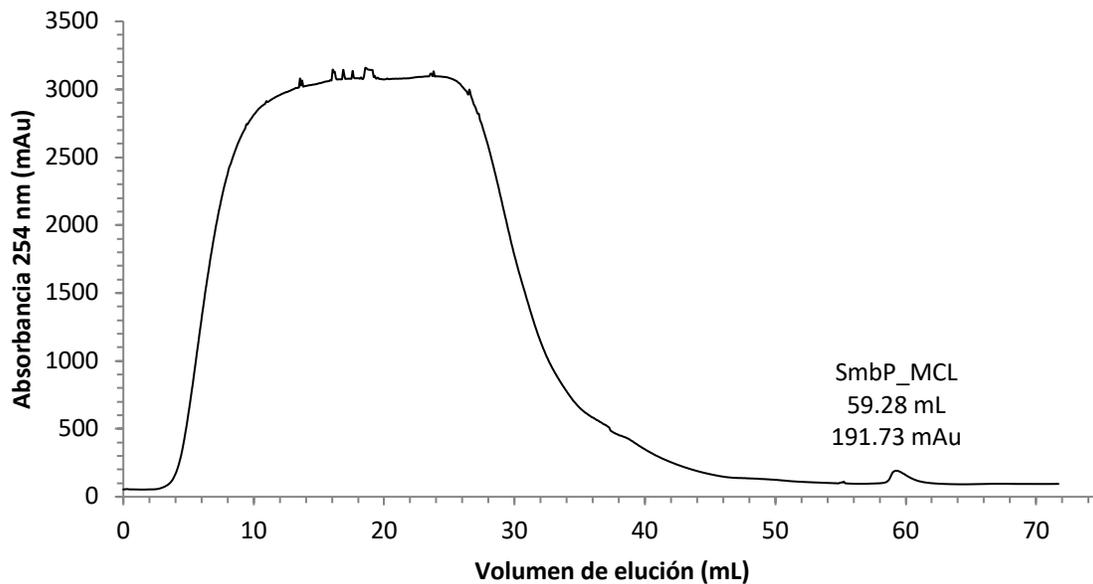


Figura 36. Cromatograma de purificación por afinidad a Ni(II) para SmbP_MCL expresada en Native Folder. Solución amortiguadora de lisis y lavado: 50 mM Tris, 500 mM NaCl, 5 mM imidazol, pH 8 y solución amortiguadora de elución: 50 mM Tris, 500 mM NaCl, 200 mM imidazol, pH 8. El pico de elución se obtuvo a los 59.28 mL de elución con una absorbancia de 191.73 mAu.

En la Figura 37 se observa el análisis de las fracciones de elución obtenidas. En los carriles 1 y 11 se encuentra el marcador de peso molecular, seguido del lisado de *E. coli* en el carril 2, el percolado en el carril 3 y la fracción de lavado en el carril 4, a partir del carril 5 – 10 y 12 – 20 se muestran las fracciones de elución obtenidas de la purificación. Como se puede observar en el lisado se aprecia una banda entre los 15 y 35 kDa que corresponde a SmbP_MCL (31.72 kDa), así mismo se observa la misma banda en el percolado, lo que significa que no la proteína no se unió por completo a la resina, también se puede observar que a partir del carril 7 aparece la banda en las fracciones de elución, en donde los carriles 8 – 10 muestran una mayor cantidad de proteína eluída.

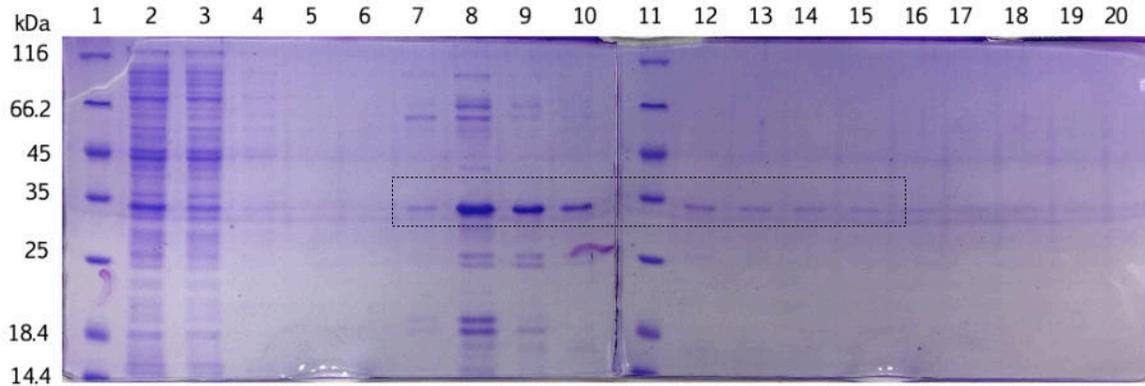


Figura 37. Análisis de fracciones de elución de SmbP_MCL (31.72 kDa) expresada en Native Folder mediante SDS-PAGE 15%. Carriles 1 y 11: marcador de peso molecular, carril 2: lisado, carril 3: percolado, carril 4: lavado, carriles 5-10 y 12-20: fracciones de elución.

5.16 Remoción del tag: cromatografía por intercambio aniónico

Las fracciones anteriores se recolectaron y se dializaron con 50 mM Tris, pH 8 y se cuantificaron por el método Bradford obteniendo una concentración de 0.26 mg/mL dando un total de 2.06 mg/0.5L. Posteriormente se llevó a cabo la reacción con enteroquinasa agregando 8 μ L (41.2 U) a los 2.06 mg de SmbP_MCL. La reacción se llevó a cabo a 22 °C durante 20 horas.

Una vez terminada la reacción de digestión, la muestra se desgasificó y se purificó por intercambio aniónico usando una columna HiTrap™ Q FF, una presión de 0.5 MPa, flujo de 0.3 mL/min y se recolectaron fracciones de 500 μ L. En la Figura 38 se observa el cromatograma de elución en el cual se obtuvieron 4 picos de elución.

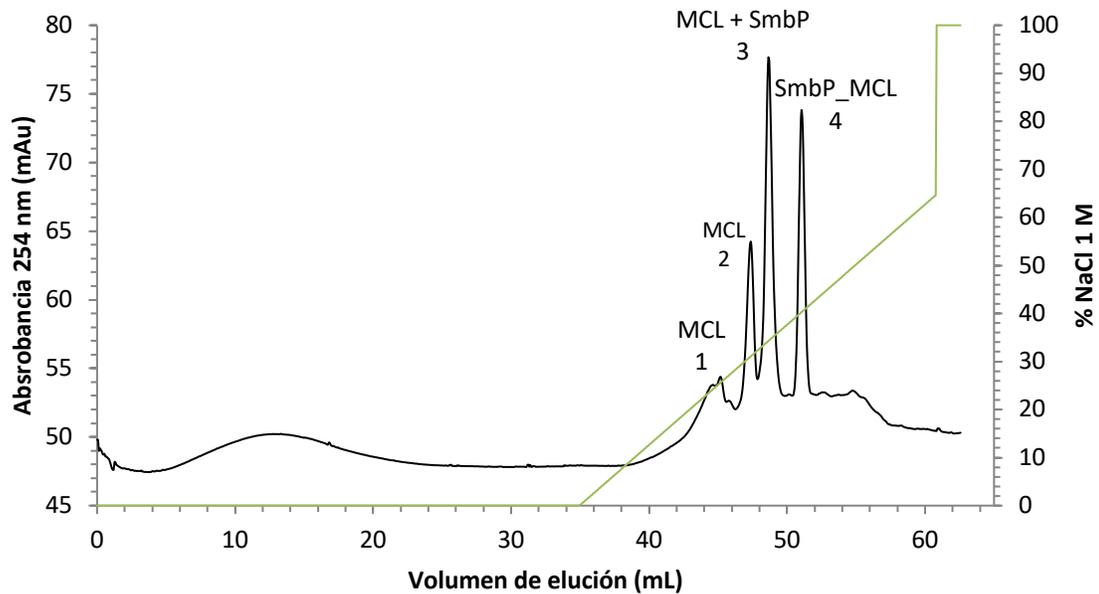


Figura 38. Cromatograma de purificación por intercambio aniónico para SmbP + MCL después de digerir con enteroquinasa. Buffer de equilibrio: 50 mM Tris, pH 8, y buffer de elución: 50 mM Tris, 1M NaCl, pH 8. El pico 1 se obtuvo a los 45.18 mL de elución con una absorbancia de 54.38 mAu y una concentración de 256 mM de NaCl (25.6%). El pico 2 se obtuvo a los 47.38 mL de elución con una absorbancia de 64.22 mAu y una concentración de 311 mM de NaCl (31.1%). El pico 3 se obtuvo a los 48.64 mL de elución con una absorbancia de 77.64 mAu y una concentración de 343 mM de NaCl (34.3%). El pico 4 se obtuvo a los 51.04 mL de elución con una absorbancia de 73.81 mAu y una concentración de 403 mM de NaCl (40.3%).

Todas las fracciones de los picos de elución 1-4 se analizaron por SDS-PAGE 15%. Los resultados se muestran en la Figura 39, en donde los carriles 1 y 16 corresponden al marcador de peso molecular, en el carril 2 la muestra sin digerir en donde se puede observar la banda característica por debajo de los 35 kDa; en el carril 3 la muestra digerida con enteroquinasa por 20 horas en donde se aprecia la aparición de MCL (31.72 kDa) y SmbP (9.8 kDa) aunque también se observa que no se completó la digestión al 100%; a partir del carril 4 comienzan las fracciones de elución. Se puede observar también que solo en las fracciones 12 – 15 se observa la banda de MCL y a partir de la fracción 17 a la 25 se aprecian las bandas de MCL y SmbP, lo que significa que no se obtuvieron en fracciones separadas. Finalmente debido a la que digestión no se llevó por completo, aparece la banda de la quimera en las fracciones 26 – 30. En esta misma

Figura, se puede apreciar la presencia de otras bandas contaminantes que no pudieron ser removidas.

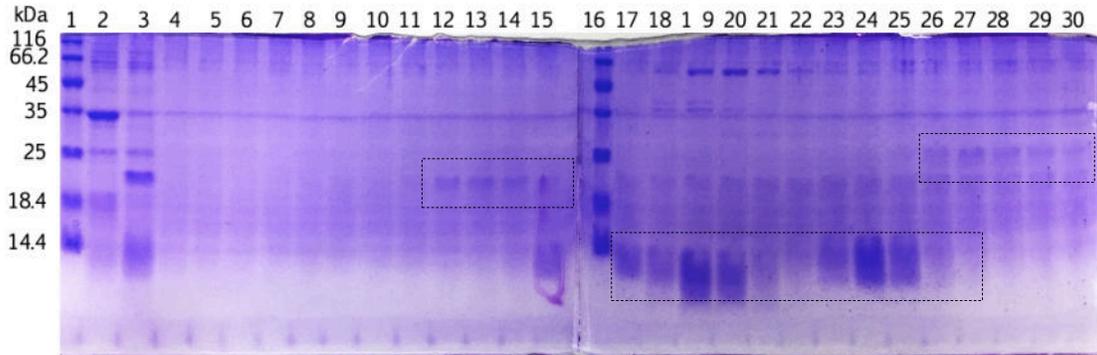


Figura 39. Análisis de fracciones de elución de la separación de SmbP (9.8 kDa) + MCL (21.35 kDa) por IA mediante SDS-PAGE 15%. Carriles 1 y 16: marcador de peso molecular, carril 2: SmbP_MCL sin digerir, carril 3: Digestión de SmbP_MCL con enteroquinasa, carriles 12-15: fracciones de elución de MCL, carriles 17-25: fracciones de elución de MCL + SmbP y carriles 26-30: fracciones de elución de SmbP_MCL.

5.17 Evaluación de la actividad de MCL

Las fracciones que solo contenían la proteína MCL, se dializaron en 170 mM NaCl, pH 3.7 y se evaluaron mediante un análisis sensorial. 5 individuos que reportan buena salud colocaron 500 μ L en la boca de cada estándar de sacarosa, entre cada uno se enjuagaron la boca con agua. Se colocaron 500 μ L (0.150 mg) la proteína en la boca y la mantuvieron por 3 minutos, se enjuagaron la boca con agua y se aplicaron 2 mL de 20 mM citrato de sodio y evaluaron la presencia o ausencia de sabor. Ninguno de los individuos detectó actividad alguna.

5.18 Clonación

5.18.1 CusF3H+_Scygonadin, SmbP_Scygonadin y PelB_SmbP_Scygonadin

Las construcciones CusF3H+_Scygonadin, SmbP_Scygonadin y PelB_SmbP_Scygonadin se llevaron a cabo utilizando la metodología de los puntos 4.4 y 4.5. Una vez confirmada la presencia de inserto se evaluó la expresión de esta proteína mediante una microexpresión con previa transformación en la cepa *E. coli* SHuffle.

5.19 Microexpresión de CusF3H+_Scygonadin, SmbP_Scygonadin y PelB_SmbP_Scygonadin

La Figura 40 representa las microexpresiones de PelB_SmbP_Scygonadin (21.1 kDa), CusF3H+_Scygonadin (21.4 kDa) y SmbP_Scygonadin (21.1 kDa). Para las proteínas CusF3H+_Scygonadin y SmbP_Scygonadin se evaluaron dos condiciones de expresión, la primera a 17 °C por 16 horas con una concentración final de IPTG 0.1 mM y la segunda condición a 37 °C por 16 horas con una concentración final de IPTG 0.01 mM. Para la expresión con PelB_SmbP se utilizaron las siguientes condiciones 17 °C por 16 horas con una concentración final de IPTG 0.1 mM. En la Tabla 16 se resume cada una de las muestras evaluadas junto con las condiciones de expresión y los pesos esperados. Los resultados a 17 °C con CusF3H+ y SmbP muestran una banda de expresión mucho más grande que a 37 °C que coinciden con los pesos esperados de la proteína. Si bien hay expresión a 37 °C esta es mucho más baja. Para el caso de PelB_SmbP se logra observar la aparición de una banda en la fracción hipotónica que corresponde con el peso deseado (21.1 kDa) y que comparandola con la expresión citoplasmática con CusF3H+ y SmbP se logra observar una menor contaminación con proteínas de la bacteria.

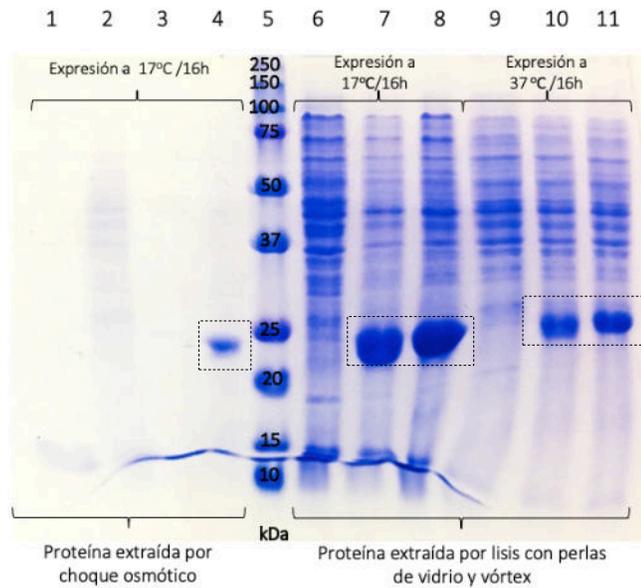


Figura 40. Microexpresión a diferentes condiciones de PelB_SmbP_Scygonadin (21.1 kDa), CusF3H+_Scygonadin (21.4 kDa) y SmbP_Scygonadin (21.1 kDa). Carril 1: F- Hiper. *E. coli* BL21(DE3), carril 2: F. hipo *E. coli* BL21(DE3), carril 3: F. Hiper PelB_SmbP_Scygonadin, carril 4: F. Hipo. PelB_SmbP_Scygonadin, carril 5: marcador de peso molecular, carril 6: control negativo *E. coli* Shuffle T7 express a 17 °C /16 horas/0.1 mM IPTG, carril 7: CusF3H+_Scygonadin, carril 8: SmbP_Scygonadin, carril 9: control negativo *E. coli* Shuffle T7 express a 37 °C /16 horas/0.1 mM IPTG, carril 10: CusF3H+_Scygonadin y carril 11: SmbP_Scygonadin.

Tabla 16. Muestras de microexpresión a diferentes condiciones de PelB_SmbP_Scygonadin, CusF3H+_Scygonadin y SmbP_Scygonadin.

Carril	Muestra	Condiciones de expresión	kDa
1	Fracción hipertónica <i>E. coli</i> BL21(DE3)		----
2	Fracción hipotónica <i>E. coli</i> BL21(DE3)		----
3	F. Hiper. PelB_SmbP_Scygonadin	17 °C /16 horas/0.1 mM IPTG	21.1 kDa
4	F. Hipo. PelB_SmbP_Scygonadin		
5	Marcador de peso molecular		----
6	<i>E. coli</i> Shuffle T7 express		----
7	CusF3H+_Scygonadin	17 °C /16 horas/0.1 mM IPTG	21.4 kDa
8	SmbP_Scygonadin		
9	<i>E. coli</i> Shuffle T7 express		----
10	CusF3H+_Scygonadin	37 °C /16 horas/0.1 mM IPTG	21.4 kDa
11	SmbP_Scygonadin		

5.20 Expresión y purificación IMAC: CusF3H+_Scygonadin y SmbP_Scygonadin.

Se expresó 1L de medio LB con cada una de las proteínas con las siguientes condiciones de expresión 17 °C por 16 horas con una concentración final de 0.1 mM IPTG. Las células se recolectaron y se lisaron y se purificaron con una columna His-Trap FF de 1 mL. Las Figuras 41 y 42 muestran el cromatograma de purificación con elución en un paso y el análisis de la purificación de CusF3H+_Scygonadin respectivamente, en donde se observa una alta concentración de proteínas en las fracciones de elución (carriles 8 – 15) puesto que se observa una gran banda entre los 20 y 25 kDa que corresponde con el peso deseado de 21.4 kDa. Las fracciones de juntaron y se cuantificaron por BCA obteniendo 6.23 mg/L de resina, un total 49.84 mg/L de expresión.

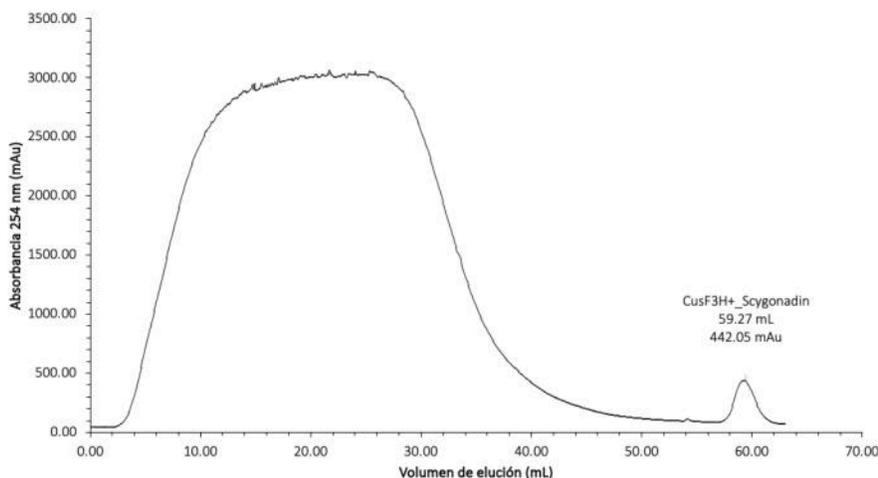


Figura 41. Cromatograma de purificación por afinidad a Ni(II) para CusF3H+_Scygonadin. Solución amortiguadora de lisis y lavado: 50 mM Tris, 500 mM NaCl, 5 mM imidazol, pH 8 y solución amortiguadora de elución: 50 mM Tris, 500 mM NaCl, 200 mM imidazol, pH 8.

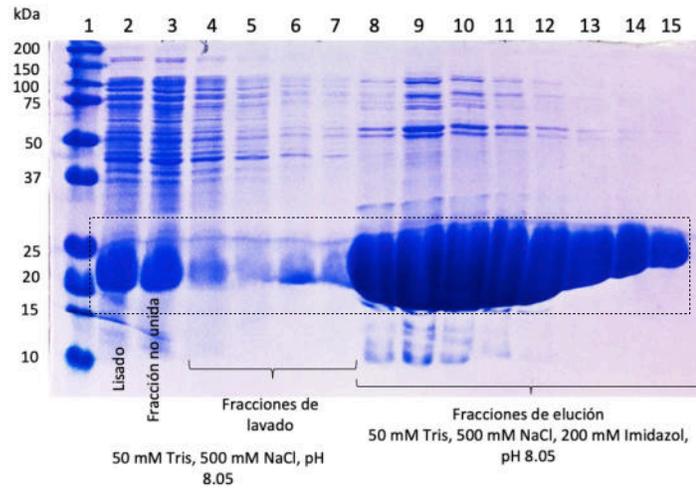


Figura 42. Análisis de fracciones de purificación IMAC de CusF3H+_Scygonadin (21.4 kDa) por SDS-PAGE 12%. Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: lisado/clarificado, carril 3: percolado/fracción no unida, carriles 4 – 7: fracciones de lavado con 50 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 8.05, carriles 8 – 15: fracciones de elución de CusF3H+_Scygonadin.

Al igual que con CusF3H+, se expresó 1L de SmbP_Scygonadin, para ambas proteínas se usaron las mismas condiciones de expresión y purificando con resina. En las Figuras 43 y 44 se logra observar el cromatograma de purificación y los resultados de la purificación de SmbP_Scygonadin. En las fracciones de elución (Figura 44) se logra observar una banda ancha de SmbP_Scygonadin que corresponde al peso deseado 21.1 kDa. También es posible observar que una gran parte de la muestra se pierde (carril 3) ya que no se unió a la resina y en comparación con CusF3H+_Scygonadin se logra observar una mayor pérdida de proteína en las fracciones de lavado. Las fracciones de elución se juntaron y se cuantificaron por BCA obteniendo 4.04 mg/mL de resina un total de 38.38 mg/L de expresión de SmbP_Scygonadin.

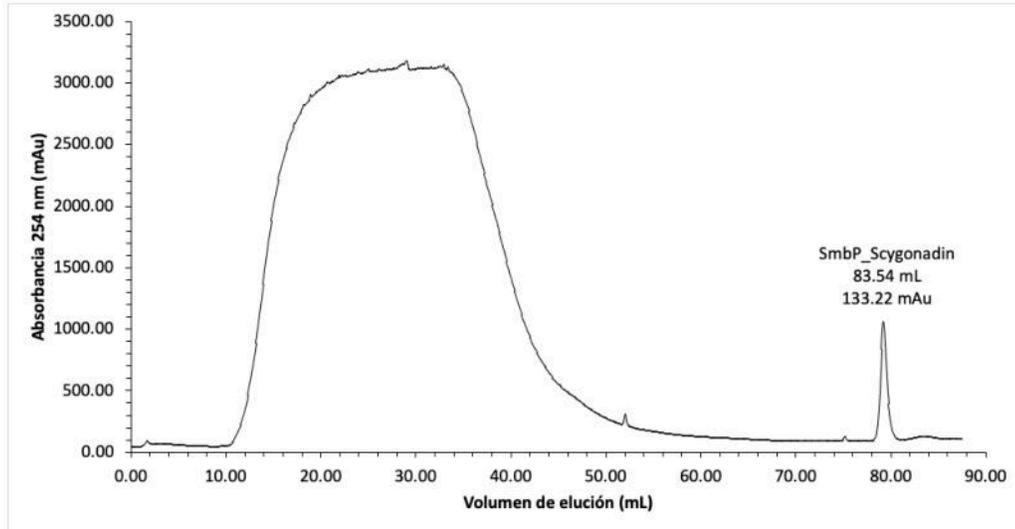


Figura 43. Cromatograma de purificación por afinidad a Ni(II) para SmbP_Scygonadin. Solución amortiguadora de lisis y lavado: 50 mM Tris, 500 mM NaCl, 5 mM imidazol, pH 8 y solución amortiguadora de elución: 50 mM Tris, 500 mM NaCl, 200 mM imidazol, pH 8.

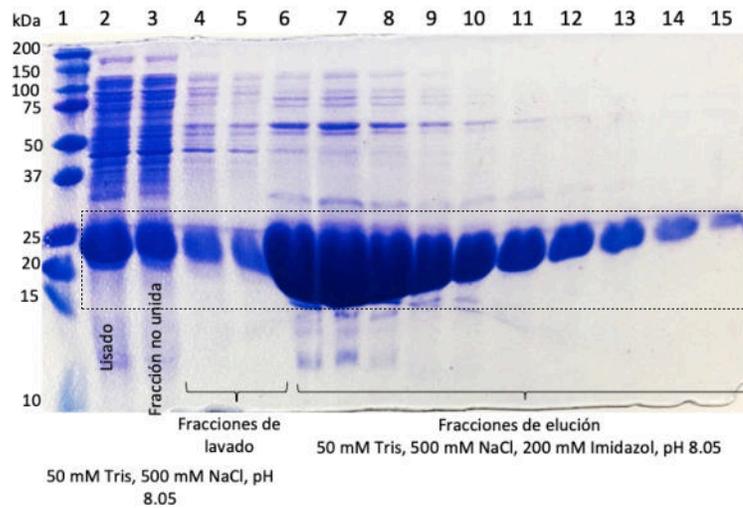


Figura 44. Análisis de fracciones de purificación IMAC de SmbP_Scygonadin (21.1 kDa) por SDS-PAGE 12%. Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: lisado/clarificado, carril 3: percolado/fracción no unida, carriles 4 y 5: fracciones de lavado con 50 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 8.05, carriles 6 – 15: fracciones de elución de SmbP_Scygonadin.

5.21 Digestión con enteroquinasa y remoción del tag: CusF3H+_Scygonadin y SmbP_Scygonadin.

Para la digestión de CusF3H+_Scygonadin con enteroquinasa se digirieron 3.13 mg de quimera con 10 μ L de enzima (3.2 μ L de enzima/mg de proteína); la reacción se llevó a cabo a 25 °C durante 16 horas. El proceso se replicó para SmbP_Scygonadin en donde se digirieron 2.02 mg de quimera con 6.5 μ L de enzima.

Al finalizar la reacción las muestras digeridas de CusF3H+_Scygonadin y SmbP_Scygonadin se purificaron con la resina HisPur Ni-NTA y las fracciones se analizaron por SDS-PAGE al 15%. Los resultados se presentan en las Figuras 45 y 46.

Como se puede observar (Figura 45) la digestión con enteroquinasa permitió la separación de CusF3H+ (10.15 kDa) y Scygonadin (11.27 kDa). Dado que CusF3H+ posee la habilidad de unirse a la resina, Scygonadin se pudo recuperar en la fracción no unida y en las fracciones de lavado.

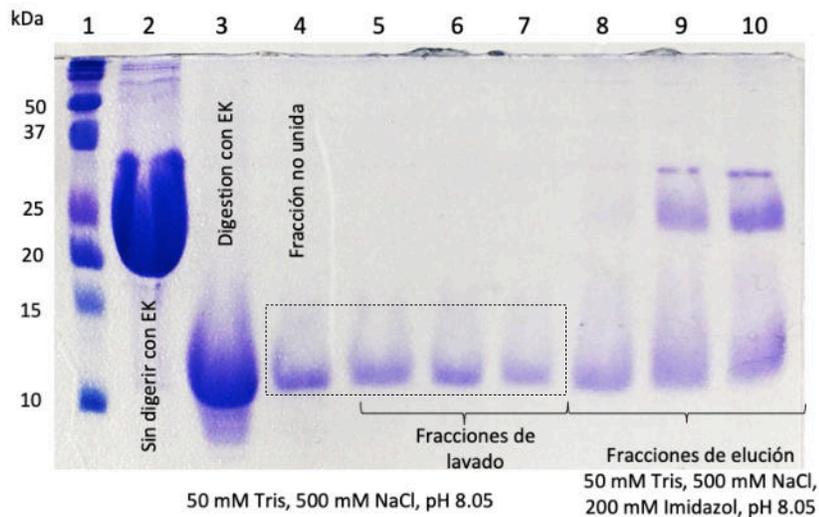


Figura 45. Reacción con enteroquinasa (EK) para la remoción del tag de CusF3H+_Scygonadin (21.4). Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: CusF3H+_Scygonadin (21.4 kDa) sin digerir, carril 3: CusF3H+ (10.15 kDa) + Scygonadin (11.27 kDa) después de la digestión con enteroquinasa, carril 4: percolado/fracción no unida, carriles 5 – 7: fracciones de lavado, carriles 8 – 10: fracciones de elución.

Los resultados para fueron muy similares para la quimera con SmbP. La Figura 46 muestra la separación de SmbP (9.8 kDa) y Scygonadin (11.27 kDa); en donde igualmente se pudo recuperar la proteína de interés (Scygonadin) en la fracción no unida y en las fracciones de lavado.

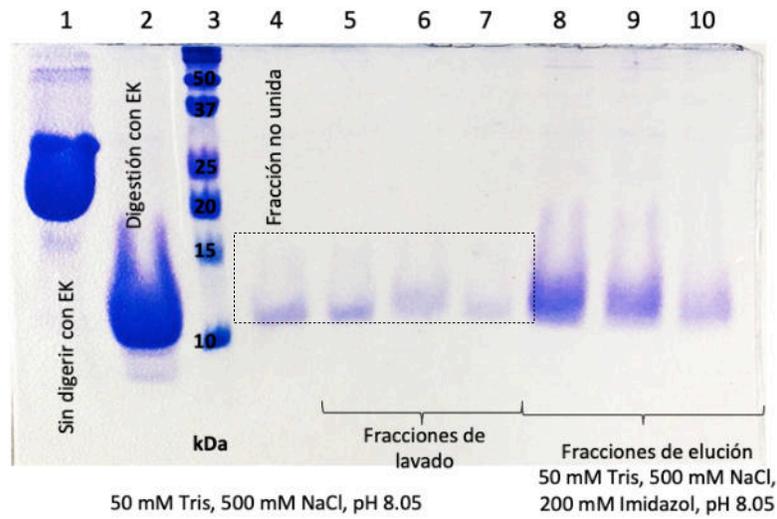


Figura 46. Reacción con enteroquinasa (EK) para la remoción del tag de SmbP_Scygonadin (21.1 kDa). Carril 1: SmbP_Scygonadin (21.1 kDa) sin digerir, carril 2: SmbP (9.8 kDa) + Scygonadin (11.27 kDa) después de la digestión con enteroquinasa, carril 3: marcador de peso molecular, carril 4: percolado/fracción no unida, carriles 5 – 7: fracciones de lavado, carriles 8 – 10: fracciones de elución.

5.22 Evaluación de la actividad de Scygonadin

Las fracciones que solo contenían la proteína Scygonadin que fueron obtenidas de su expresión con CusF3H+ y SmbP se dializaron por separado en 50 mM Tris, pH 8.05 y se evaluaron mediante un ensayo en placa (ensayo preliminar). Las placas con LB se sembraron con *E. coli* y *S. aureus* y a cada una se le añadieron discos de papel filtro con la proteína absorbida, las placas se incubaron a 37 °C durante 16 horas. Después de la incubación se analizaron las placas en busca de halos de inhibición. Los resultados no mostraron la presencia de halo.

Al no observar halo de inhibición en la prueba preliminar, se llevó a cabo un análisis de concentración mínima inhibitoria. Se evaluó Scygonadin obtenida con CusF3H+ y SmbP contra *Staphylococcus aureus*. Los resultados de scygonadin obtenida con CusF3H+ no mostraron inhibición del crecimiento de la cepa. Por otra parte, la Scygonadin obtenida con SmbP se envaluó contra *S. aureus*, se utilizaron una serie de concentraciones del antimicrobiano (8.0, 4.0, 2.0, 1.0, and 0.5 μM) los resultados mostraron una MIC de 4.23 μM como se muestra en la Figura 47.

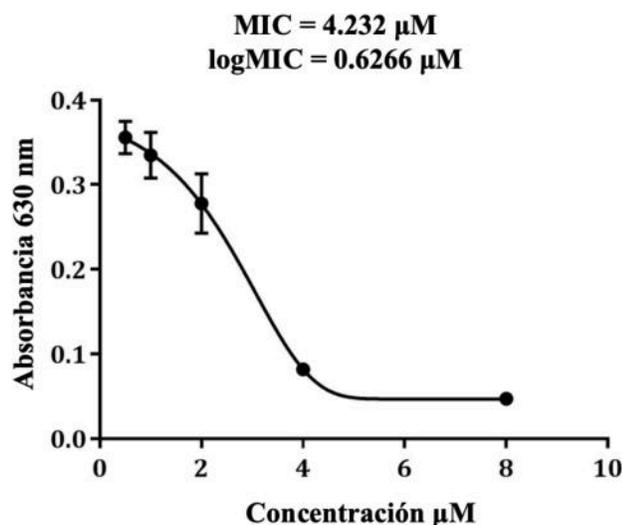


Figura 47. Actividad antimicrobiana de Scygonadin contra 1×10^5 UFC/mL de *Staphylococcus aureus*. Los puntos en la gráfica representan cada concentración de Scygonadin evaluada a las 24 h de incubación. Las barras de error representan la desviación estándar entre las tres replicas. El resultado de la prueba T de Student reveló diferencias significativas contra el control negativo ($p < 0.05$).

5.23 Clonación por tándems: Brazzein3xNG, Rattusin2xNG y Rattusin3xNG

5.23.1 Síntesis de genes y clonación

La secuencia de aminoácidos que codifica para las proteínas Brazzein3xNG, Rattusin2xNG y Rattusin3xNG se diseñaron colocando los aminoácidos NG, los cuales son el sitio de corte para la hidroxilamina. Las Tablas 17, 18 y 19 muestran las secuencias de aminoácidos, la secuencia de ADN y el peso de cada gen; el sitio NG se representa en

verde. Los tres genes se clonaron con las proteínas de fusión CusF3H+, SmbP y PelB_SmbP.

Tabla 17. Secuencia de nucleótidos y aminoácidos que codifican para Brazzein3xNG

Secuencia de nucleótidos y aminoácidos que codifican para Brazzein3xNG																
CCATGGCT	AAC	GGT	GAC	AAG	TGC	AAG	AAA	GTG	TAC	GAG	AAC	TAT	CCG	GTT	AGC	
NcoI	N	G	D	K	C	K	K	V	Y	E	N	Y	P	V	S	15
AAA	TGC	CAG	CTG	GCG	AAC	CAA	TGC	AAC	TAC	GAC	TGC	AAG	CTG	GAT	AAA	CAC
K	C	Q	L	A	N	Q	C	N	Y	D	C	K	L	D	K	H
32																
GCG	CGT	AGC	GGC	GAG	TGC	TTC	TAT	GAT	GAA	AAG	CGT	AAC	CTG	CAG	TGC	ATC
A	R	S	G	E	C	F	Y	D	E	K	R	N	L	Q	C	I
49																
TGC	GAC	TAC	TGC	GAG	TAT	AAC	GGC	GAT	AAA	TGC	AAG	AAA	GTG	TAT	GAA	AAT
C	D	Y	C	E	Y	N	G	D	K	C	K	K	V	Y	E	N
66																
TAC	CCG	GTG	AGC	AAG	TGC	CAA	CTG	GCG	AAT	CAG	TGC	AAT	TAT	GAT	TGC	AAA
Y	P	V	S	K	C	Q	L	A	N	Q	C	N	Y	D	C	K
83																
CTG	GAC	AAG	CAT	GCG	CGC	AGC	GGC	GAA	TGC	TTT	TAT	GAC	GAA	AAA	CGT	AAC
L	D	K	H	A	R	S	G	E	C	F	Y	D	E	K	R	N
100																
CTG	CAA	TGC	ATT	TGC	GAT	TAT	TGC	GAA	TAC	AAC	GGC	GAT	AAG	TGC	AAG	AAA
L	Q	C	I	C	D	Y	C	E	Y	N	G	D	K	C	K	K
117																
GTG	TAT	GAG	AAT	TAC	CCG	GTG	AGC	AAA	TGC	CAA	CTG	GCG	AAT	CAA	TGC	AAT
V	Y	E	N	Y	P	V	S	K	C	Q	L	A	N	Q	C	N
134																
TAT	GAT	TGC	AAG	CTG	GAC	AAG	CAT	GCG	CGT	AGC	GGT	GAG	TGC	TTC	TAC	GAC
Y	D	C	K	L	D	K	H	A	R	S	G	E	C	F	Y	D
151																
GAA	AAG	CGT	AAC	CTG	CAG	TGT	ATC	TGC	GAT	TAC	TGC	GAA	TAT	TAA	CTCGAG	
E	K	R	N	L	Q	C	I	C	D	Y	C	E	Y	Stop	XhoI	165
Pares de bases			Aminoácidos				Peso en kDa				Punto Isoeléctrico (PI)					
495			165				19.58				6.88					

Tabla 18. Secuencia de nucleótidos y aminoácidos que codifican para Rattusin2xNG

Secuencia de nucleótidos y aminoácidos que codifican para Rattusin2xNG																	
CCATGGCT	AAC	GGT	CTG	CGT	GTG	CGT	CGT	ACC	CTG	CAG	TGC	AGC	TGC	CGT	CGT		
NcoI	N	G	L	R	V	R	R	T	L	Q	C	S	C	R	R	15	
GTT	TGC	CGT	AAC	ACC	TGC	AGC	TGC	ATC	CGT	CTG	AGC	CGT	AGC	ACC	TAC	GCG	
V	C	R	N	T	C	S	C	I	R	L	S	R	S	T	Y	A	32
AGC	AAC	GGC	CTG	CGC	GTT	CGT	CGT	ACC	CTG	CAA	TGC	AGC	TGC	CGT	CGT	GTG	
S	N	G	L	R	V	R	R	T	L	Q	C	S	C	R	R	V	49
TGC	CGC	AAT	ACC	TGC	AGC	TGC	ATT	CGC	CTG	AGC	CGT	AGC	ACC	TAT	GCG	AGC	
C	R	N	T	C	S	C	I	R	L	S	R	S	T	Y	A	S	66
TAA	CTCGAG																
Stop	XhoI																
Pares de bases	Aminoácidos		Peso en kDa		Punto Isoeléctrico (PI)												
198	66		7.62		11.38												

Tabla 19. Secuencia de nucleótidos y aminoácidos que codifican para Rattusin3xNG

Secuencia de nucleótidos y aminoácidos que codifican para Rattusin3xNG																	
CCATGGCT	AAC	GGT	CTG	CGT	GTG	CGT	CGT	ACC	CTG	CAG	TGC	AGC	TGC	CGT	CGT		
NcoI	N	G	L	R	V	R	R	T	L	Q	C	S	C	R	R	15	
GTT	TGC	CGT	AAC	ACC	TGC	AGC	TGC	ATC	CGT	CTG	AGC	CGT	AGC	ACC	TAC	GCG	
V	C	R	N	T	C	S	C	I	R	L	S	R	S	T	Y	A	32
AGC	AAC	GGC	CTG	CGC	GTT	CGT	CGT	ACC	CTG	CAA	TGC	AGC	TGC	CGT	CGT	GTG	
S	N	G	L	R	V	R	R	T	L	Q	C	S	C	R	R	V	49
TGC	CGC	AAT	ACC	TGC	AGC	TGC	ATT	CGC	CTG	AGC	CGT	AGC	ACC	TAT	GCG	AGC	
C	R	N	T	C	S	C	I	R	L	S	R	S	T	Y	A	S	66
AAC	GGC	CTG	CGC	GTT	CGT	CGT	ACC	CTG	CAA	TGC	AGC	TGC	CGT	CGT	GTG	TGC	
N	G	L	R	V	R	R	T	L	Q	C	S	C	R	R	V	C	83
CGC	AAT	ACC	TGC	AGC	TGC	ATT	CGC	CTG	AGC	CGT	AGC	ACC	TAT	GCG	AGC	TAA	
R	N	T	C	S	C	I	R	L	S	R	S	T	Y	A	S	Stop	99
CTCGAG																	
XhoI																	
Pares de bases	Aminoácidos		Peso en kDa		Punto Isoeléctrico (PI)												
297	99		11.42		11.44												

5.23.2 Confirmación de insertos: construcciones con CusF3H+ y SmbP

Para confirmar la presencia de los insertos en el plásmido pET30a(+)_CusF3H+ se realizó un análisis de restricción utilizando las enzimas NcoI y XhoI. En el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular, en el carril 2 ADN plasmídico de CusF3H+_Brazzein3xNG, en el carril 3 ADN plasmídico de CusF3H+_Rattusin2xNG y en el carril 4 ADN plasmídico de CusF3H+_Rattusin3xNG. Los pesos esperados eran de 495 pb, 198 pb y 297 pb, respectivamente. En la Figura 48 se puede observar que las tres construcciones son positivas, ya que las bandas de cada gen aparecen en el tamaño correcto.

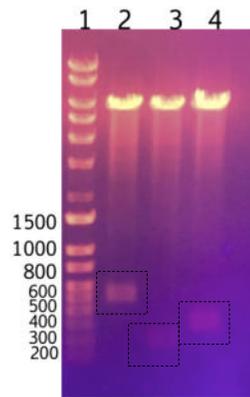


Figura 48. Análisis de restricción con NcoI y XhoI para la confirmación de las construcciones en tándem con CusF3H+ en gel de agarosa al 0.7%. Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: CusF3H+_Brazzein3xNG (495 pb), carril 3: CusF3H+_Rattusin2xNG (198 pb) y carril 4: CusF3H+_Rattusin3xNG (297 pb).

Los insertos de las construcciones con el plásmido pET30a(+)_SmbP se confirmaron mediante PCR utilizando los oligonucleótidos T7 delantero y T7 reverso. Para esta PCR se utilizaron los ADNs plasmídicos que se obtuvieron a partir de las clonas resultantes de la transformación de los productos de ligación. La Figura 49 se observan los resultados de la PCR, en el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular, en los carriles 2, 3 y 4 los ADNs plasmídicos de SmbP_Brazzein3xNG (989 pb) analizados, los carriles 5, 6 y 7 los ADNs plasmídicos de SmbP_Rattusin3xNG (791 pb), en los carriles 8,

9 y 10 los ADNs plasmídicos de SmbP_Rattusin2xNG (692 pb) y en el carril 11 el control negativo con enzima sin ADN molde. Se puede observar que todas las construcciones son positivas ya que se obtuvieron los amplicones en el peso deseado.

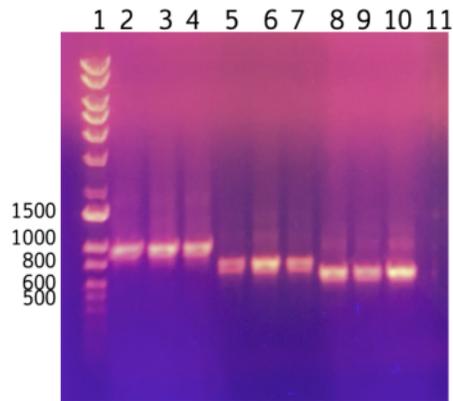


Figura 49. Productos de PCR para la confirmación de las construcciones en tándem con SmbP en gel de agarosa al 0.7%. Carril 1: marcador de peso molecular, carriles 2, 3 y 4: SmbP_Brazzein3xNG (989 pb), carriles 5, 6 y 7: SmbP_Rattusin3xNG (791 pb), carriles 8,9 y 10: SmbP_Rattusin2xNG (692 pb).

5.24 Microexpresion de tándems

La Figura 50 representa las microexpresiones a (25 °C, 0.1 M IPTG por 16 horas) de los tándems con CusF3H+ como proteína de fusión. Las muestras se lisaron con perlas de vidrio en vórtex por 4 minutos. En el carril 1 se encuentra el marcador de peso molecular, en el carril 2 el control negativo e de *E. coli* SHuffle, en el carril 3 el control positivo de CusF3H+_STOP, en el carril 4 CusF3H+_Brazzein3xNG (30.31 kDa), en el carril 5 CusF3H+_Rattusin2xNG (18.34 kDa), y en el carril 5 CusF3H+_Rattusin3xNG (22.14 kDa). Se logra visualizar solo se expresa la proteína CusF3H+_Brazzein3xNG debido a la aparición de una banda cercana a los 35 kDa, que corresponde con el peso esperado de 30.31 kDa. Sin embargo, no se logra apreciar la expresión de CusF3H+_Rattusin2xNG y CusF3H+_Rattusin3xNG.

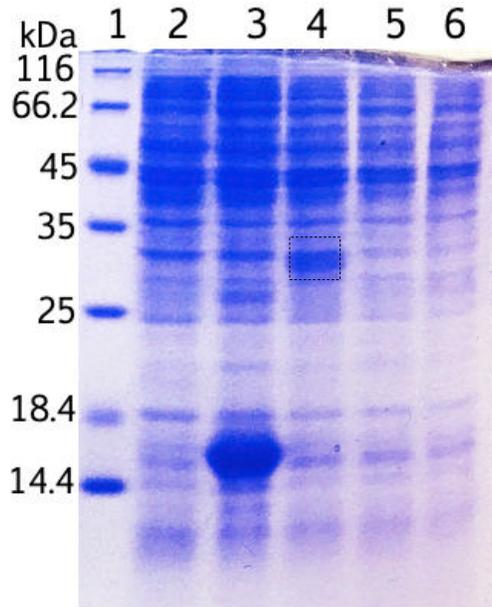


Figura 50. Microexpresión en *E. coli* SHuffle de tandems con CusF3H+ por SDS-PAGE 15%. Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: control negativo de *E. coli* SHuffle, carril 3: control positivo de CusF3H+_STOP (10.15), carril 4: CusF3H+_Brazzein3xNG (30.31 kDa), carril 5: CusF3H+_Rattusin2xNG (18.34 kDa), carril 5: CusF3H+_Rattusin3xNG (22.14 kDa).

Ya que los tándems de Rattusin no se expresaron con CusF3H+ se llevó a cabo la expresión con SmbP, en este experimento se varió la temperatura de expresión y los tiempos de expresión; los cuales fueron: 25 °C por 16 horas, 37 °C por 4 horas y 37 °C por 16 horas, en todas las expresiones se indujo con 0.1 M de IPTG y las muestras se prepararon con lisis por calentamiento (95 °C/10 minutos) y lisis con perlas de vidrio. La Figura 51 muestra los resultados de este experimento en la cepa *E. coli* SHuffle los cuales se describen en la Tabla 20.

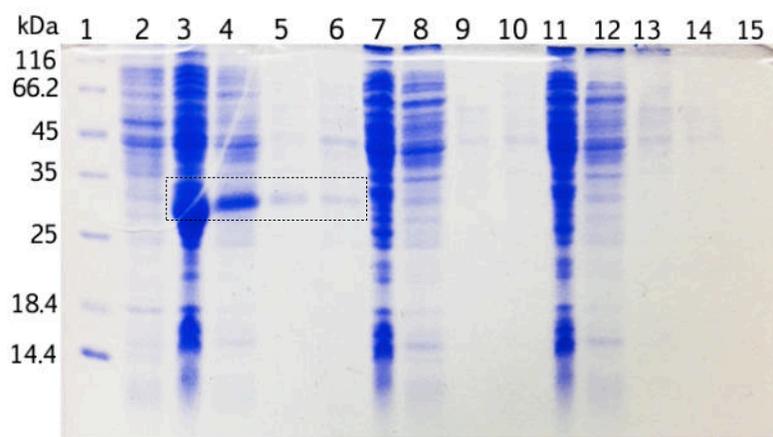


Figura 51. Análisis de expresión de los tándems SmbP_Brazzein3xNG (30.02 kDa), SmbP_Rattusin 2xNG (18.05 kDa) y SmbP_Rattusin3xNG (21.86 kDa) en *E. coli* SHuffle por SDS-PAGE 15%. Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: control negativo *E. coli* SHuffle, carriles 3, 4, 5 y 6: SmbP_Brazzein3xNG, carriles: 7, 8 9 y 10: SmbP_Rattusin2xNG, carriles 11, 12, 13 y 14: SmbP_Rattusin3xNG.

Tabla 20. Tratamientos de expresión en *E. coli* SHuffle y lisis celular para las proteínas SmbP_Brazzein3xNG, SmbP_Rattusin2xNG y SmbP_Rattusin3xNG.

Carril	Muestra	Tratamiento
1	Marcador de peso molecular	No aplica
2	Control negativo <i>E. coli</i> SHuffle	No aplica
3	SmbP_Brazzein3xNG (30.02 kDa)	25 °C/16 horas con lisis por calentamiento
4	SmbP_Brazzein3xNG	25 °C/16 horas con lisis con perlas de vidrio
5	SmbP_Brazzein3xNG	37 °C/4 horas con lisis con perlas de vidrio
6	SmbP_Brazzein3xNG	37 °C/16 horas con lisis con perlas de vidrio
7	SmbP_Rattusin2xNG (18.05 kDa)	25 °C/16 horas con lisis por calentamiento
8	SmbP_Rattusin2xNG	25 °C/16 horas con lisis por calentamiento
9	SmbP_Rattusin2xNG	37 °C/4 horas con lisis con perlas de vidrio
10	SmbP_Rattusin2xNG	37 °C/16 horas con lisis con perlas de vidrio
11	SmbP_Rattusin3xNG (21.86 kDa)	25 °C/16 horas con lisis por calentamiento
12	SmbP_Rattusin3xNG	25 °C/16 horas con lisis con perlas de vidrio
13	SmbP_Rattusin3xNG	37 °C/4 horas con lisis con perlas de vidrio
14	SmbP_Rattusin3xNG	37 °C/16 horas con lisis con perlas de vidrio
15	Nada	Nada

En el caso del tándem SmbP_Brazzein3xNG se observa que hay mayor expresión a los 25 °C/16 horas ya se aprecia una banda mucho más grande en esas condiciones que a los 37 °C. En el caso de los tándems de Rattusin2xNG y 3xNG, no hay aparición de una banda proteínica, lo que significa que no se están expresando.

El experimento anterior se realizó de la misma manera, pero ahora en la cepa de *E. coli* Origami2(DE3), las muestras y condiciones se describen en la Tabla 21.

Tabla 21. Tratamientos de expresión en *E. coli* Origami2(DE3) y lisis celular para las proteínas SmbP_Brazzein3xNG, SmbP_Rattusin2xNG y SmbP_Rattusin3xNG.

Carril	Muestra	Tratamiento
1	Nada	Nada
2	Marcador de peso molecular	No aplica
3	SmbP_STOP	25 °C/16 horas con lisis por calentamiento
4	SmbP_Brazzein3xNG (30.02 kDa)	25 °C/16 horas con lisis por calentamiento
5	SmbP_Brazzein3xNG	25 °C/16 horas con lisis con perlas de vidrio
6	SmbP_Brazzein3xNG	37 °C/4 horas con lisis con perlas de vidrio
7	SmbP_Brazzein3xNG	37 °C/16 horas con lisis con perlas de vidrio
8	SmbP_Rattusin2xNG (18.05 kDa)	25 °C/16 horas con lisis por calentamiento
9	SmbP_Rattusin2xNG	25 °C/16 horas con lisis por calentamiento
10	SmbP_Rattusin2xNG	37 °C/4 horas con lisis con perlas de vidrio
11	SmbP_Rattusin2xNG	37 °C/16 horas con lisis con perlas de vidrio
12	SmbP_Rattusin3xNG (21.86 kDa)	25 °C/16 horas con lisis por calentamiento
13	SmbP_Rattusin3xNG	25 °C/16 horas con lisis con perlas de vidrio
14	SmbP_Rattusin3xNG	37 °C/4 horas con lisis con perlas de vidrio
15	SmbP_Rattusin3xNG	37 °C/16 horas con lisis con perlas de vidrio

En este caso (Figura 52) se puede observar que hay una menor expresión de SmbP_Brazzein3xNG en comparación con la cepa *E. coli* SHuffle; por otro lado, los tándems de Rattusin siguen sin expresarse.

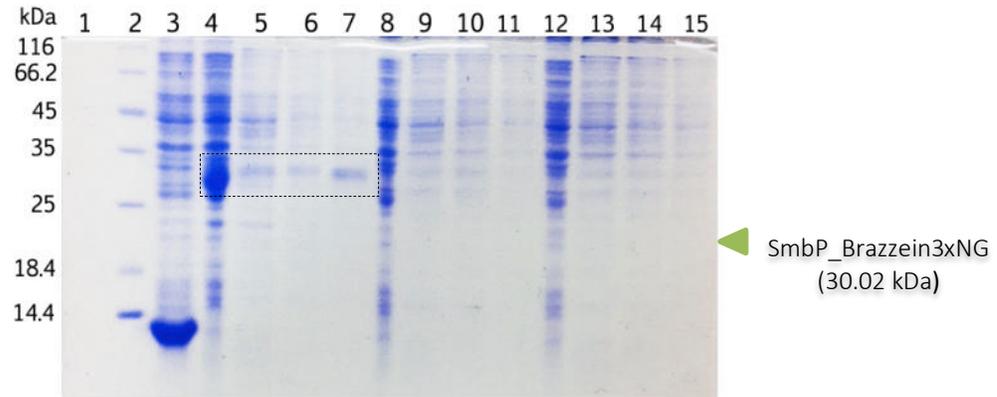


Figura 52. Análisis de expresión de los tándems SmbP_Brazzein3xNG (30.02 kDa), SmbP_Rattusin2xNG (18.05 kDa) y SmbP_Rattusin3xNG (21.86 kDa) en *E. coli* Origami2(DE3) por SDS-PAGE 15%. Carril 2: marcador de peso molecular, carril 3: control positivo SmbP_STOP (9.8 kDa), carriles 4, 5, 6 y 7: SmbP_Brazzein3xNG, carriles: 8, 9, 10 y 11: SmbP_Rattusin2xNG, carriles 12, 13, 14 y 15: SmbP_Rattusin3xNG.

Al observar que los tándems de Rattusin no se expresaban, se llevaron a cabo otros experimentos en los cuales se aumentaba la masa celular, el medio de cultivo y la concentración de inductor, sin embargo, todos los resultados fueron negativos.

5.25 Purificación SmbP_Brazzein3xNG

5.25.1 Cromatografía IMAC

Se expresó 1L de SmbP_Brazzein3xNG a 25 °C por 16 horas con 0.1 M de IPTG. Se purificaron 30 mL del clarificado de proteína utilizando una columna HiTrap™ IMAC FF. En la Figura 53 se muestra el cromatograma de purificación por afinidad a Ni(II) de SmbP_Brazzein3xNG. Una vez que la muestra se unió a la resina de la columna, ésta fue lavada con la solución amortiguadora de unión (50 mM Tris, 500 mM NaCl, 5 mM imidazol, pH 8) hasta que la absorbancia disminuyó, posteriormente se realizó la elución por gradiente con 50 mM Tris, 500 mM NaCl, 200 mM imidazol pH 8 en fracciones de 1 mL cada una.

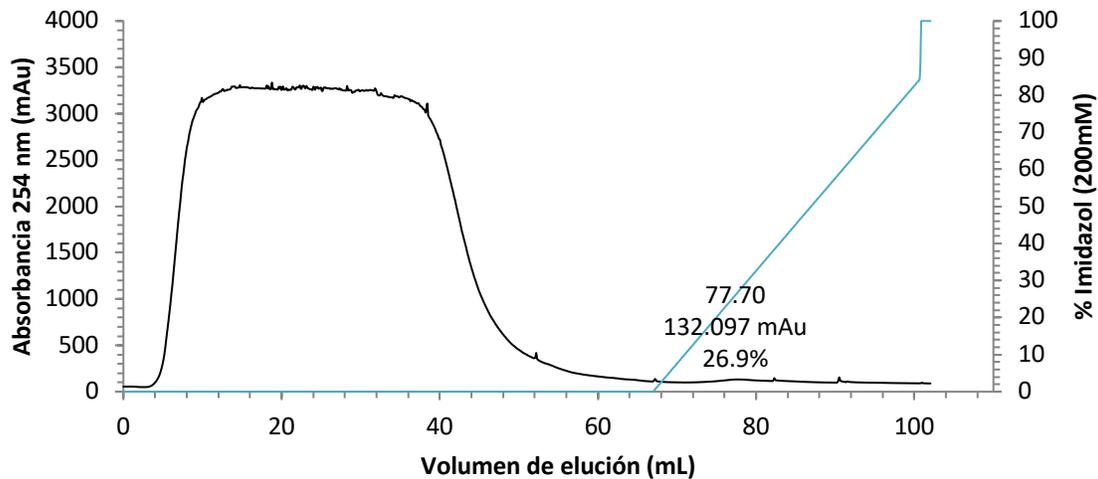


Figura 53. Cromatograma de purificación por afinidad a Ni(II) para SmbP_Brazzein_NG3X con gradiente de elución. Solución amortiguadora de lisis: 50 mM Tris, 500 mM NaCl, 5 mM imidazol, solución amortiguadora de lavado: 50 mM Tris, 500 mM NaCl, 10 mM imidazol y solución amortiguadora de elución: 50 mM Tris, 500 mM NaCl, 200 mM imidazol pH 8. El pico de elución más alto se obtuvo a los 77.7 mL de elución con una absorbancia de 132.09 mAu.

En la Figura 54 se muestra el análisis de las fracciones de elución. Los carriles 1 y 17: muestran el marcador de peso molecular, el carril 2 el clarificado, seguido del percolado en el carril 3 y el lavado en el carril 4, los carriles 5 – 16 y 18 – 30 muestran las fracciones de elución. Se puede observar que una parte de la proteína se encuentra en el percolado, lo que significa que no se unió a la resina, incluso hay un poco de proteína en el lavado. De esta purificación se obtuvo la proteína bastante pura puesto que no se observan muchos contaminantes extras.

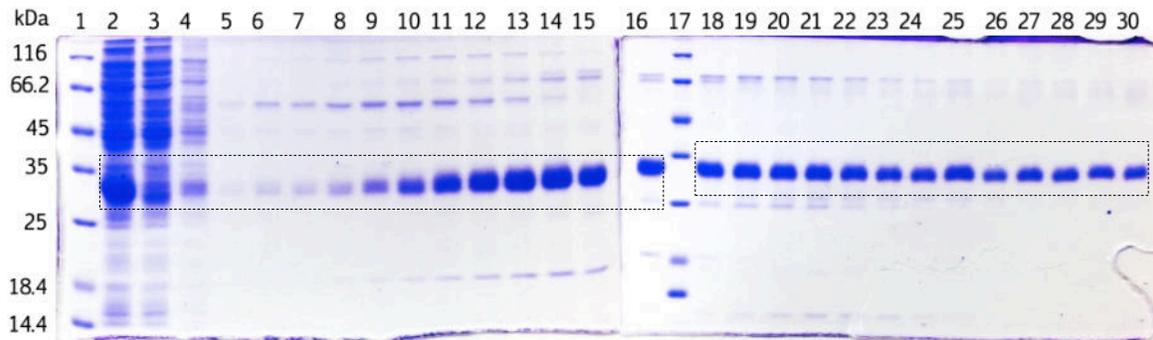


Figura 54. Análisis de fracciones de elución de SmbP_Brazzein3xNG (30.02 kDa) mediante SDS-PAGE 15%. Carriles 1 y 17: marcador de peso molecular, carril 2: clarificado, carril 3: percolado, carril 4: lavado, carriles 5-16 y 18-30: fracciones de elución.

5.26 Digestión química con hidroxilamina

Para separar los monómeros de brazzein de la proteína SmbP_Brazzein3xNG se llevó a cabo una reacción con hidroxilamina (NH_2OH). Se preparó una solución de 4 M NH_2OH , 50 mM Tris, pH 8.54 y en un tubo eppendorf se colocaron 300 μL (160 μg) de proteína con 100 μL de la solución de NH_2OH /Tris obteniendo una concentración final de 1M NH_2OH ; en otro tubo se colocaron 300 μL (160 μg) de proteína con 300 μL de la solución de NH_2OH /Tris obteniendo una concentración final de 2M NH_2OH . Ambas reacciones se incubaron a 45 °C con agitación a 50 rpm por 20 horas. Se tomaron muestras a 1, 2, 3, 4, 17 y 20 horas de reacción.

En la Figura 55 se observa la digestión de SmbP_Brazzein3xNG a diferentes tiempos de reacción y con concentraciones de NH_2OH de 1M y 2M. En el carril 1 se encuentra el marcador de peso molecular, en el carril 2 SmbP_Brazzein3xNG sin digerir, en los carriles 3-8 la digestión con 1M NH_2OH a la 1, 2, 3, 4, 17 y 20 horas, en los carriles 9-14 a digestión con 2M NH_2OH a la 1, 2, 3, 4, 17 y 20 horas. Se puede observar que en las muestras con 1M a las 17 y 20 horas de reacción, desaparece la banda que corresponde a la quimera (30.02 kDa) sin embargo no se logra apreciar SmbP (9.8 kDa) ni el

monómero de Brazzein (6.37 kDa). Este fenómeno se presentó de la misma manera en las reacciones con 2 M de NH_2OH

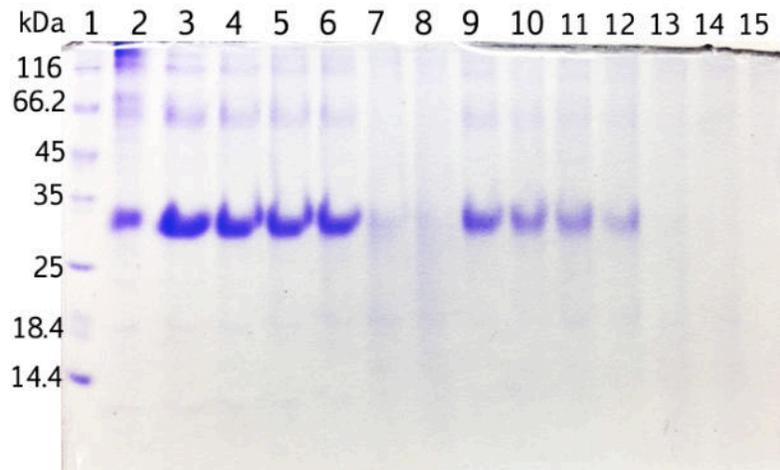


Figura 55. Análisis de digestión con hidroxilamina a 1M y 2M para SmbP_Brazzein3xNG (30.02 kDa) mediante Tricina-SDS-PAGE 15%. Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: SmbP_Brazzein3xNG sin digerir, carriles 3-8: digestión con 1 M NH_2OH a 1, 2, 3, 4, 17 y 20 horas de reacción, carriles 9-14: digestión con 2 M NH_2OH a 1, 2, 3, 4, 17 y 20 horas de reacción.

Este ensayo se repitió varias veces, pero en ninguno se pudo observar la aparición de las bandas que corresponden a SmbP y a Brazzein. Por lo tanto, se continuaron los experimentos para separar SmbP del tándem Brazzein3xNG y evaluar la actividad del tándem completo.

5.27 Remoción del tag: cromatografía por intercambio aniónico

Las fracciones anteriores se recolectaron y se dializaron con 50 mM Tris, pH 8 y se cuantificaron por el método BCA obteniendo una concentración de 0.209 mg/mL dando un total de 6.27 mg/L. Posteriormente se llevó a cabo la reacción con enteroquinasa agregando 3 μL (1.5 U) por mg de proteína. La reacción se llevó a cabo a 22 °C durante 22 horas.

Una vez terminada la reacción de digestión, la muestra se desgasificó y se purificó por intercambio aniónico usando una columna HiTrap™ Q FF, una presión de 0.3 MPa, flujo de 0.2 mL/min y se recolectaron fracciones de 500 μ L. En la Figura 56 se observa el cromatograma de elución en el cual se obtuvieron 3 picos de elución.

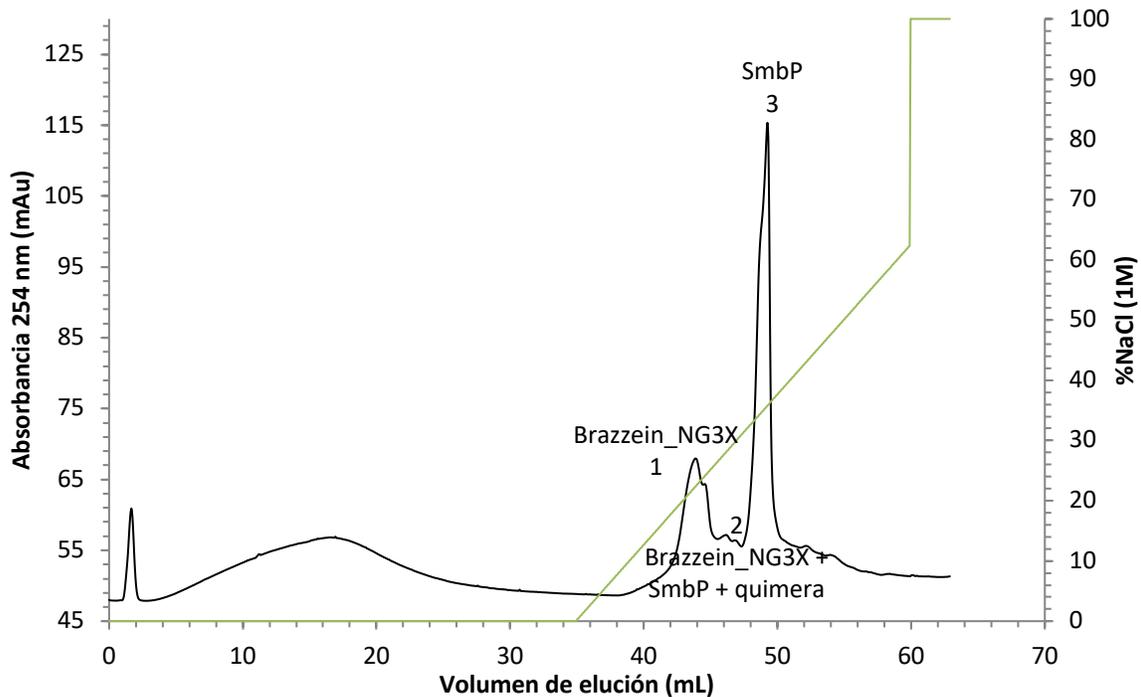


Figura 56. Cromatograma de purificación por intercambio aniónico para SmbP + Brazzein3xNG después de digerir con enteroquinasa. Buffer de equilibrio: 50 mM Tris, pH 8, y buffer de elución: 50 mM Tris, 1M NaCl, pH 8. El pico 1 se obtuvo a los 43.89 mL de elución con una absorbancia de 67.94 mAu y una concentración de 224 mM de NaCl (22.4%). El pico 2 se obtuvo a los 45.23 mL de elución con una absorbancia de 56.97 mAu y una concentración de 258 mM de NaCl (25.8%). El pico 3 se obtuvo a los 49.24 mL de elución con una absorbancia de 115.34 mAu y una concentración de 358 mM de NaCl (35.8%).

En la Figura 57 se presenta el análisis de las fracciones de elución obtenidas de la cromatografía por intercambio aniónico. En los carriles 1 y 17 se observa el marcador de peso molecular, las fracciones de elución del pico 1 se observan en los carriles 2 – 14,

las del pico de elución 2 se encuentran en los carriles 15 – 21 y las eluciones de pico 3 en los carriles 22 – 26. En el carril 27 se muestra la proteína sin digerir con enteroquinasa y en los carriles 28, 29 y 30 la digestión a las 16, 20 y 22 horas de reacción respectivamente. Con respecto a la digestión con enteroquinasa se puede observar que a las 22 horas de reacción no se logró un 10% de digestión puesto que a parte de las bandas de Brazzein3xNG (19.58 kDa) y de SmbP (9.8 kDa) se sigue observando la banda de la quimera. Además, en esta misma Figura se puede observar que en las fracciones de los carriles 5 – 14 se obtuvo la proteína Brazzein3xNG pura; mientras que en los otros carriles se mantienen juntas tanto la proteína de fusión SmbP como la proteína de interés y la quimera.

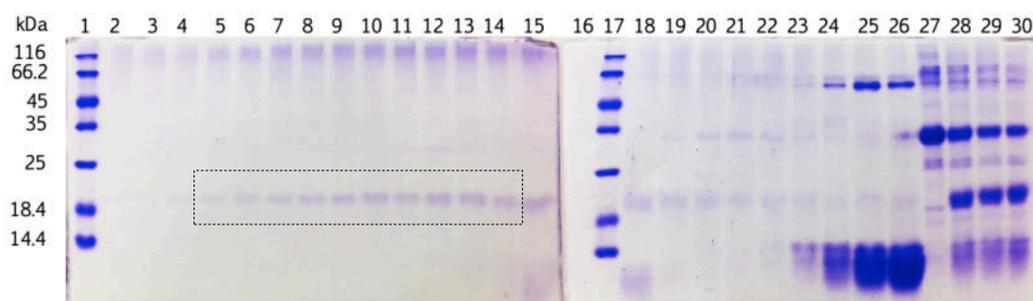


Figura 57. Análisis de fracciones de elución de la separación de SmbP (9.8 kDa) + Brazzein3xNG (19.58 kDa) por IA mediante SDS-PAGE 15%. Carriles 1 y 17: marcador de peso molecular, carriles 2-15: fracciones de elución de Brazzein3xNG, carriles 18-26: fracciones de elución de Brazzein3xNG + SmbP + quimera, carril 27: SmbP_Brazzein3xNG sin digerir, carriles 28, 29 y 30: digestión de SmbP_Brazzein3xNG con enteroquinasa a las 16, 20 y 22 horas de reacción respectivamente.

5.28 Evaluación de la actividad: Brazzein3xNG

Para la evaluación de la actividad se recolectaron las fracciones de Brazzein3xNG y se dializaron con agua. Se cuantificaron con el método BCA y se obtuvo una concentración de 0.450 mg/mL. La actividad la evaluaron 5 individuos tomando 200 μ L de una solución de sacarosa al 1% para determinar si percibían la dulzura, una vez que la percibieron, se enjugaron la boca con agua y posteriormente se colocaron 200 μ L de la proteína, sin embargo, no se detectó dulzura.

5.29 Clonación por tándems con uniones flexibles: Brazzein FLEX, Scygonadin FLEX y Hepcidin FLEX

5.29.1 Síntesis de genes y clonación

La secuencia de aminoácidos que codifica para las proteínas Brazzein FLEX, Scygonadin FLEX y Hepcidin FLEX se enviaron a la empresa GenScript y fueron optimizadas para su expresión en *E. coli*. Para las secuencias se utilizaron los sitios de restricción NcoI (CCATGGCT) y XhoI (CTCGAG) entre cada repetición de la secuencia se colocaron los aminoácidos GGGGSGGGGSGGGGS las secuencias seleccionadas como uniones flexibles.

En las Tablas 22, 23 y 24 se muestran las secuencias de aminoácidos, la secuencia de ADN y el peso de cada gen. En azul se señalan los sitios de restricción y en verde los aminoácidos de las uniones flexibles. Los tres genes se clonaron en los plásmidos pET30a(+)_SmbP y pET30a(+)_CusF3H+ y pET30a(+)_PelB_SmbP. Para los procesos de clonación se utilizaron las metodologías establecidas en la sección 4.5.

Tabla 22. Secuencia de nucleótidos y aminoácidos que codifican para Brazzein FLEX

Secuencia de nucleótidos y aminoácidos que codifican para Brazzein FLEX																
CCATGGCT	GAC	AAG	TGC	AAG	AAA	GTG	TAC	GAG	AAC	TAT	CCG	GTT	AGC	AAA	TGC	
NcoI	D	K	C	K	K	V	Y	E	N	Y	P	V	S	K	C	15
CAG	CTG	GCG	AAC	CAA	TGC	AAC	TAC	GAC	TGC	AAG	CTG	GAT	AAA	CAC	GCG	CGT
Q	L	A	N	Q	C	N	Y	D	C	K	L	K	D	H	A	R
																32
AGC	GGC	GAG	TGC	TTC	TAT	GAC	GAA	AAG	CGT	AAC	CTG	CAG	TGC	ATC	TGC	GAT
S	G	E	C	F	Y	D	E	K	R	N	L	Q	C	I	C	D
																49
TAC	TGC	GAG	TAT	GGT	GGC	GGT	GGC	AGC	GGT	GGC	GGT	GGC	AGC	GGT	GGC	GGT
Y	C	E	Y	G	G	G	G	S	G	G	G	G	S	G	G	G
																66
GGC	AGC	GAT	AAA	TGC	AAG	AAA	GTG	TAT	GAA	AAT	TAC	CCG	GTG	AGC	AAG	TGC
G	S	D	K	C	K	K	V	Y	E	N	Y	P	V	S	K	C
																83
CAG	CTG	GCG	AAT	CAG	TGC	AAT	TAT	GAT	TGC	AAG	CTG	GAC	AAG	CAT	GCG	CGT
Q	L	A	N	Q	C	N	Y	D	C	K	L	K	D	H	A	R
																100
AGC	GGT	GAA	TGC	TTT	TAT	GAC	GAA	AAA	CGT	AAC	CTG	CAA	TGC	ATT	TGC	GAC
S	G	E	C	F	Y	D	E	K	R	N	L	Q	C	I	C	D
																117
TAT	TGC	GAA	TAC	GGT	GGC	GGT	GGC	AGC	GGT	GGC	GGT	GGC	AGC	GGT	GGC	GGT
Y	C	E	Y	G	G	G	G	S	G	G	G	G	S	G	G	G
																134
GGC	AGC	GAC	AAA	TGC	AAG	AAA	GTG	TAC	GAA	AAT	TAC	CCG	GTT	TCT	AAG	TGT
G	S	D	K	C	K	K	V	Y	E	N	Y	P	V	S	K	C
																151
CAG	CTG	GCG	AAT	CAA	TGC	AAT	TAT	GAC	TGC	AAG	CTG	GAC	AAG	CAC	GCG	CGT
Q	L	A	N	Q	C	N	Y	D	C	K	L	K	D	H	A	R
																165
AGC	GGC	GAA	TGC	TTC	TAC	GAT	GAA	AAG	CGT	AAC	CTG	CAG	TGC	ATC	TGC	GAC
S	G	E	C	F	Y	D	E	K	R	N	L	Q	C	I	C	D
																182
TAC	TGC	GAA	TAT	TAA	CTCGAG											
Y	C	E	Y	Stop		XhoI										186
Pares de bases		Aminoácidos				Peso en kDa				Punto Isoeléctrico (PI)						
558		186				20.96				6.88						

Tabla 23. Secuencia de nucleótidos y aminoácidos que codifican para Scygonadin FLEX

Secuencia de nucleótidos y aminoácidos que codifican para Scygonadin FLEX																	
CCATGGCT	GGT	CAG	GCG	CTG	AAC	AAG	CTG	ATG	CCG	AAA	ATC	GTG	AGC	GCG	ATC		
NcoI	G	Q	A	L	N	K	L	M	P	K	I	V	S	A	I	15	
ATT	TAC	ATG	GTT	GGT	CAA	CCG	AAC	GCG	GGC	GTG	ACC	TTC	CTG	GGT	CAC	CAG	
I	Y	M	V	G	Q	P	N	A	G	V	T	F	L	G	H	Q	32
TGC	CTG	GTG	GAG	AGC	ACC	CGT	CAA	CCG	GAC	GGT	TTT	TAT	ACC	GCG	AAG	ATG	
C	L	V	E	S	T	R	Q	P	D	G	F	Y	T	A	K	M	49
AGC	TGC	GCG	AGC	TGG	ACC	CAC	GAT	AAC	CCG	ATC	GTT	GGT	GAA	GGC	CGT	AGC	
S	C	A	S	W	T	H	D	N	P	I	V	G	E	G	R	S	66
CGT	GTG	GAG	CTG	GAA	GCG	CTG	AAA	GGC	AGC	ATT	ACC	AAC	TTC	GTG	CAG	ACC	
R	V	E	L	E	A	L	K	G	S	I	T	N	F	V	Q	T	83
GCG	AGC	AAC	TAC	AAG	AAA	TTT	ACC	ATC	GAC	GAG	GTT	GAA	GAT	TGG	ATT	GCG	
A	S	N	Y	K	K	F	T	I	D	E	V	E	D	W	I	A	100
AGC	TAT	GGT	GGC	GGT	GGC	AGC	GGT	GGC	GGT	GGC	AGC	GGT	GGC	GGT	GGC	AGC	
S	Y	G	G	G	G	S	G	G	G	G	S	G	G	G	G	S	117
GGG	CAG	GCG	CTG	AAT	AAG	CTG	ATG	CCG	AAA	ATT	GTT	AGC	GCG	ATT	ATC	TAC	
G	Q	A	L	N	K	L	M	P	K	I	V	S	A	I	I	Y	134
ATG	GTG	GGC	CAA	CCG	AAC	GCG	GGT	GTT	ACC	TTC	CTG	GGC	CAC	CAG	TGC	CTG	
M	V	G	Q	P	N	A	G	V	T	F	L	G	H	Q	C	L	151
GTT	GAG	AGC	ACC	CGC	CAG	CCG	GAT	GGC	TTC	TAC	ACC	GCG	AAA	ATG	TCT	TGT	
V	E	S	T	R	Q	P	D	G	F	Y	T	A	K	M	S	C	168
GCG	AGC	TGG	ACC	CAT	GAC	AAC	CCG	ATC	GTG	GGC	GAG	GGC	CGT	AGC	CGT	GTT	
A	S	W	T	H	D	N	P	I	V	G	E	G	R	S	R	V	185
GAG	CTG	GAA	GCG	CTG	AAG	GGC	AGC	ATC	ACC	AAT	TTC	GTG	CAA	ACC	GCG	AGC	
E	L	E	A	L	K	G	S	I	T	N	F	V	Q	T	A	S	202
AAT	TAT	AAA	AAG	TTC	ACC	ATT	GAT	GAA	GTG	GAG	GAC	TGG	ATC	GCG	AGC	TAT	
N	Y	K	K	F	T	I	D	E	V	E	D	W	I	A	S	Y	219
TAA	CTCGAG																
Stop	XhoI																
Pares de bases	Aminoácidos		Peso en kDa		Punto Isoeléctrico (PI)												
657	219		23.47		6.11												

Tabla 24. Secuencia de nucleótidos y aminoácidos que codifican para Hepcidin FLEX

Secuencia de nucleótidos y aminoácidos que codifican para Hepcidin FLEX																
CCATGGCT	GAC	ACC	CAC	TTC	CCG	ATC	TGC	ATC	TTC	TGC	TGC	GGT	TGC	TGC	CAC	
NcoI	D	T	H	F	P	I	C	I	F	C	C	G	C	C	H	15
CGT	AGC	AAG	TGC	GGC	ATG	TGC	TGC	AAG	ACC	GGT	GGC	GGT	GGC	AGC	GGT	GGC
R	S	K	C	G	M	C	C	K	T	G	G	G	G	S	G	G
GGT	GGC	AGC	GGT	GGC	GGT	GGC	AGC	GAT	ACC	CAT	TTT	CCG	ATC	TGC	ATC	TTC
G	G	S	G	G	G	G	S	D	T	H	F	P	I	C	I	F
TGC	TGT	GGC	TGC	TGC	CAT	CGT	AGC	AAA	TGC	GGT	ATG	TGT	TGT	AAG	ACC	GGT
C	C	G	C	C	H	R	S	K	C	G	M	C	C	K	T	G
GGC	GGT	GGC	AGC	GGT	GGC	GGT	GGC	AGC	GGT	GGC	GGT	GGC	AGC	GAC	ACT	CAT
G	G	G	S	G	G	G	G	S	G	G	G	G	S	D	T	H
TTT	CCG	ATC	TGC	ATC	TTC	TGC	TGT	GGG	TGC	TGC	CAT	CGT	AGC	AAG	TGT	GGC
F	P	I	C	I	F	C	C	G	C	C	H	R	S	K	C	G
ATG	TGC	TGC	AAA	ACC	TAA	CTCGAG										
M	C	C	K	T	Stop	XhoI										105
Pares de bases		Aminoácidos			Peso en kDa			Punto Isoeléctrico (PI)								
315		105			10.24			8.42								

5.30 Microexpresión en *E. coli* SHuffle de proteínas FLEX

Para todas las microexpresiones de las construcciones con uniones flexibles (denominadas FLEX) se llevaron a cabo se evaluaron dos condiciones de expresión, a 17 °C por 16 horas con una concentración final de IPTG 0.1 mM y a 37 °C por 16 horas con una concentración final de IPTG 0.01 mM. Para la expresión con PelB_SmbP se utilizaron las siguientes condiciones 17 °C por 16 horas con una concentración final de IPTG 0.1 mM.

5.30.1 CusF3H+_Brazzein FLEX, SmbP_Brazzein FLEX, PelB_SmbP_Brazzein FLEX

La Figura 58 representa las microexpresiones de PelB_SmbP_Brazzein FLEX (31.4 kDa), CusF3H+_Brazzein FLEX (31.68 kDa) y SmbP_Brazzein FLEX (31.4 kDa). En la Tabla 25 se resume cada una de las muestras evaluadas junto con las condiciones de expresión y los pesos esperados. Los resultados a 17 °C con CusF3H+ y SmbP muestran una banda de expresión que corresponde con el peso esperado con la proteína, sin embargo, se logra observar una mayor expresión con SmbP. A diferencia con la condición de 37 °C en donde no se logra observar expresión con CusF3H+, y aunque hay algo de expresión con SmbP, esta es menor que a 17 °C. La expresión periplásmica con PelB no mostró ninguna banda.

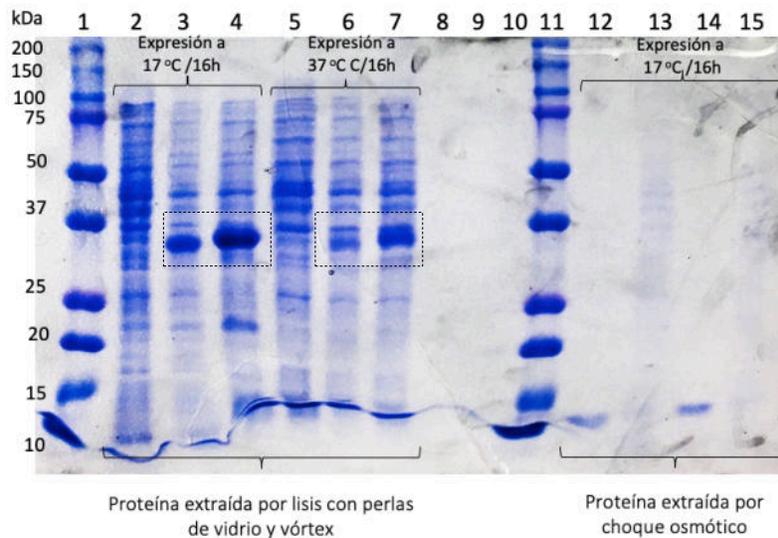


Figura 58. Microexpresión a diferentes condiciones de PelB_SmbP_Brazzein FLEX (31.4 kDa), CusF3H+_Brazzein FLEX (31.68 kDa) y SmbP_Brazzein FLEX (31.4 kDa). Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: control negativo *E. coli* SHuffle a 17 °C /16 horas/0.1 mM IPTG, carril 3: CusF3H+_Brazzein FLEX, carril 4: SmbP_Brazzein FLEX, carril 5: control negativo *E. coli* SHuffle a 37 °C /16 horas/0.1 mM IPTG, carril 6: CusF3H+_Brazzein FLEX, carril 7: SmbP_Brazzein FLEX, carril 11: marcador de peso molecular, carril 12: F. Hiper. *E. coli* BL21(DE3), carril 13: F. Hipo *E. coli* BL21(DE3), carril 14: F. Hiper PelB_SmbP_Scygonadin FLEX, carril 15: F. Hipo PelB_SmbP_Brazzein FLEX.

Tabla 25. Muestras de microexpresión a diferentes condiciones de PelB_SmbP_Brazzein FLEX, CusF3H+_Brazzein FLEX y SmbP_Brazzein FLEX.

Carril	Muestra	Condiciones de expresión	kDa
1	Marcador de peso molecular		-----
2	<i>E. coli</i> SHuffle		-----
3	CusF3H+_Brazzein FLEX	17 °C /16 horas/0.1 mM IPTG	31.68 kDa
4	SmbP_Brazzein FLEX		31.4 kDa
5	<i>E. coli</i> SHuffle		-----
6	CusF3H+_Brazzein FLEX	37 °C /16 horas/0.1 mM IPTG	31.68 kDa
7	SmbP_Brazzein FLEX		31.4 kDa
11	Marcador de peso molecular		-----
12	Fracción hipertónica <i>E. coli</i> BL21(DE3)		-----
13	Fracción hipotónica <i>E. coli</i> BL21(DE3)	17 °C /16 horas/0.1 mM IPTG	-----
14	F. Hiper. PelB_SmbP_Brazzein FLEX		31.4 kDa
15	F. Hipo. PelB_SmbP_Brazzein FLEX		

5.30.2 CusF3H+_Scygonadin FLEX, SmbP_Scygonadin FLEX, PelB_SmbP_Scygonadin FLEX

La Figura 59 representa las microexpresiones de PelB_SmbP_Scygonadin FLEX (33.9 kDa), CusF3H+_Scygonadin FLEX (34.19 kDa) y SmbP_Scygonadin FLEX (33.9 kDa). En la Tabla 26 se resume cada una de las muestras evaluadas junto con las condiciones de expresión y los pesos esperados. Los resultados a 17 °C con CusF3H+ y SmbP muestran una banda de expresión que corresponde con el peso esperado con la proteína, a diferencia con la condición de 37 °C en donde no hay expresión alguna. Para el caso de PelB_SmbP se logra observar la aparición de una banda en la fracción hipotónica que corresponde con el peso deseado (33.9) y que comparandola con la expresión citoplasmática con CusF3H+ y SmbP es mucho más pequeña.

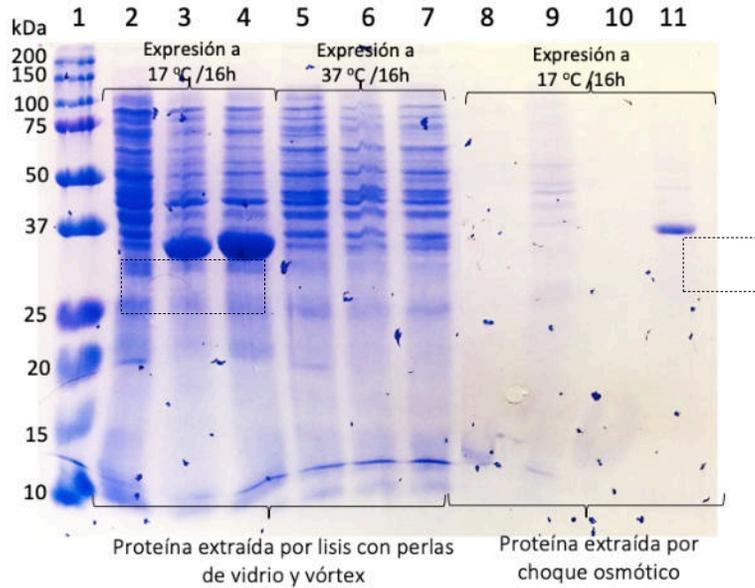


Figura 59. Microexpresión a diferentes condiciones de PelB_SmbP_Scygonadin FLEX (33.9 kDa), CusF3H+_Scygonadin FLEX (34.19 kDa) y SmbP_Scygonadin FLEX (33.9 kDa). Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: control negativo *E. coli* SHuffle a 17 °C /16 horas/0.1 mM IPTG, carril 3: CusF3H+_Scygonadin FLEX, carril 4: SmbP_Scygonadin FLEX, carril 5: control negativo *E. coli* SHuffle a 37 °C /16 horas/0.1 mM IPTG, carril 6: CusF3H+_Scygonadin FLEX, carril 7: SmbP_Scygonadin FLEX, carril 8: F. Hiper. *E. coli* BL21(DE3), carril 9: F. Hipo *E. coli* BL21(DE3), carril 10: F. Hiper PelB_SmbP_Scygonadin FLEX, carril 11: F. Hipo PelB_SmbP_Scygonadin FLEX.

Tabla 26. Muestras de microexpresión a diferentes condiciones de PelB_SmbP_Scygonadin FLEX, CusF3H+_Scygonadin FLEX y SmbP_Scygonadin FLEX.

Carril	Muestra	Condiciones de expresión	kDa
1	Marcador de peso molecular		-----
2	<i>E. coli</i> SHuffle		-----
3	CusF3H+_Scygonadin FLEX	17 °C /16 horas/0.1 mM IPTG	34.19 kDa
4	SmbP_Scygonadin FLEX		33.9 kDa
5	<i>E. coli</i> SHuffle		-----
6	CusF3H+_Scygonadin FLEX	37 °C /16 horas/0.1 mM IPTG	34.19 kDa
7	SmbP_Scygonadin FLEX		33.9 kDa
8	Fracción hipertónica <i>E. coli</i> BL21(DE3)		-----
9	Fracción hipotónica <i>E. coli</i> BL21(DE3)	17 °C /16 horas/0.1 mM IPTG	-----
10	F. Hiper. PelB_SmbP_Scygonadin FLEX		33.9 kDa
11	F. Hipo. PelB_SmbP_Scygonadin FLEX		33.9 kDa

5.30.3 CusF3H+_Hepcidin FLEX, SmbP_Hepcidin FLEX, PelB_SmbP_Hepcidin FLEX

Los resultados de la microexpresión de PelB_SmbP_Hepcidin FLEX (20.68 kDa), CusF3H+_Hepcidin FLEX (20.97 kDa) y SmbP_Hepcidin FLEX (20.68 kDa) fueron los más diferentes de las construcciones FLEX. En la Tabla 27 se resume cada una de las muestras evaluadas junto con las condiciones de expresión y los pesos esperados. Los resultados a 17 °C con CusF3H+ y SmbP (Figura 60) muestran una banda de expresión que corresponde con el peso esperado, se puede observar que la banda de expresión es mayor con SmbP que con CusF3H+, a diferencia con la condición de 37 °C en donde solo hay expresión con SmbP, y comparándolas (carriles 4 y 7) la expresión a ambas concentraciones se observa muy parecida. Para el caso de PelB_SmbP no se logra observar una banda de expresión en ninguno de los carriles (carriles 11 y 12).

Tabla 27. Muestras de microexpresión a diferentes condiciones de PelB_SmbP_Hepcidin FLEX, CusF3H+_Hepcidin FLEX y SmbP_Hepcidin FLEX.

Carril	Muestra	Condiciones de expresión	kDa
1	Marcador de peso molecular		-----
2	<i>E. coli</i> SHuffle		-----
3	CusF3H+_Hepcidin FLEX	17 °C /16 horas/0.1 mM IPTG	20.97 kDa
4	SmbP_Hepcidin FLEX		20.68 kDa
5	<i>E. coli</i> SHuffle		-----
6	CusF3H+_Hepcidin FLEX	37 °C /16 horas/0.1 mM IPTG	20.97 kDa
7	SmbP_Hepcidin FLEX		20.68 kDa
11	Marcador de peso molecular		-----
12	Fracción hipertónica <i>E. coli</i> BL21(DE3)		-----
13	Fracción hipotónica <i>E. coli</i> BL21(DE3)	17 °C /16 horas/0.1 mM IPTG	-----
14	F. Hiper. PelB_SmbP_Hepcidin FLEX		20.68 kDa
15	F. Hipo. PelB_SmbP_Hepcidin FLEX		20.68 kDa

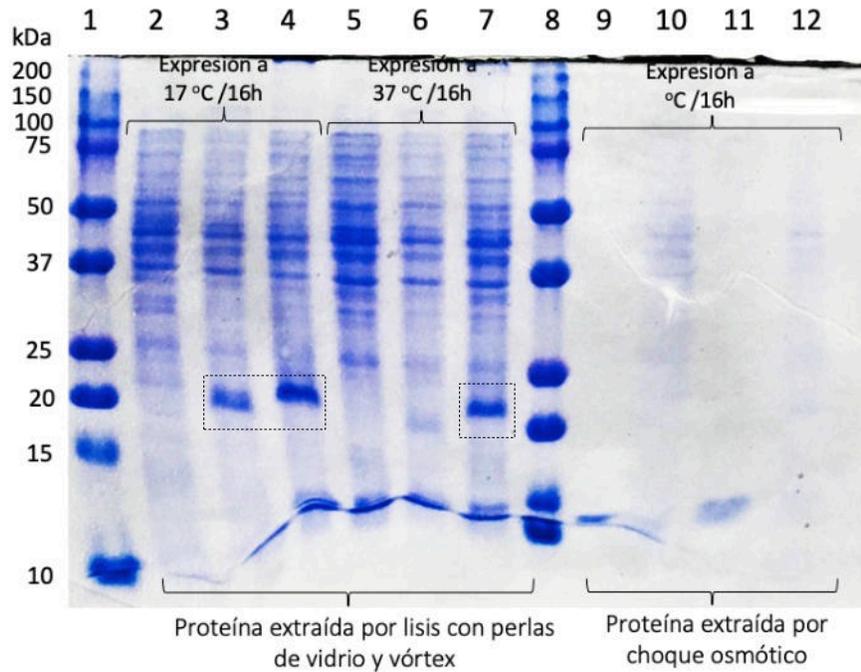


Figura 60. Microexpresión a diferentes condiciones de PelB_SmbP_Hepcidin FLEX (20.68 kDa), CusF3H+_Hepcidin FLEX (20.97 kDa) y SmbP_Hepcidin FLEX (20.68 kDa). Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: control negativo *E. coli* SHuffle a 17 °C /16 horas/0.1 mM IPTG, carril 3: CusF3H+_Hepcidin FLEX, carril 4: SmbP_Hepcidin FLEX, carril 5: control negativo *E. coli* SHuffle a 37 °C /16 horas/0.1 mM IPTG, carril 6: CusF3H+_Hepcidin FLEX, carril 7: SmbP_Hepcidin FLEX, carril 8: marcador de peso molecular, carril 9: F. Hiper. *E. coli* BL21(DE3), carril 10: F. Hipo *E. coli* BL21(DE3), carril 11: F. Hiper PelB_SmbP_Hepcidin FLEX, carril 12: F. Hipo PelB_SmbP_Hepcidin FLEX.

5.31 Expresión y purificaciones de proteínas FLEX: IMAC

Dado que en todas las microexpresiones de las construcciones FLEX se observó una mejor expresión a 17 °C por 16 horas con una concentración final de 0.1 mM IPTG, se expresó 1 L de cada una de las proteínas y se purificaron por resina (HisPur Ni-NTA, Thermo Scientific)

5.31.1 CusF3H+_Brazzein FLEX y SmbP_Brazzein FLEX

La Figura 61 muestra el análisis de la purificación de CusF3H+_Brazzein FLEX (31.68 kDa) en donde se observa que las fracciones de elución (carriles 6-15) aparece una banda entre los 25 y 37 kDa que corresponde con el peso deseado de 31.68 kDa, ahí

mismo podemos observar que la proteína tiene una pureza alta al no mostrar tantas bandas distintas a la esperada en las fracciones de elución. Así mismo vemos que toda la proteína se unió a la resina ya que no hay bandas en las fracciones de lavado. Las fracciones de elución se juntaron y se cuantificaron por BCA obteniendo 1.11 mg/mL un total 10.54 mg/L de expresión.

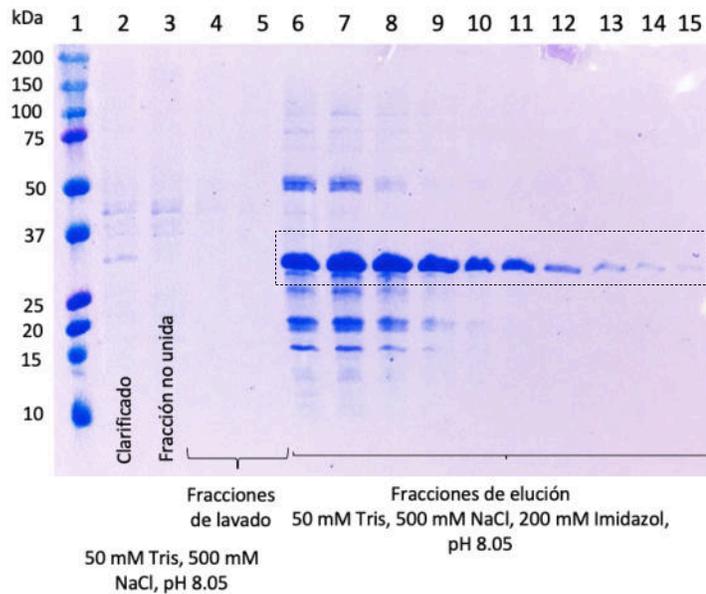


Figura 61. Análisis de fracciones de purificación IMAC de CusF3H+_Brazzein FLEX (31.68 kDa) por SDS-PAGE 12%. Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: lisado/clarificado, carril 3: percolado/fracción no unida, carriles 4 – 5: fracciones de lavado con 50 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 8.05, carriles 6 – 15: fracciones de elución de CusF3H+_Brazzein FLEX.

Al igual que con CusF3H, se expresó 1L de SmbP_Brazzein FLEX (31.4 kDa). En la Figura 62 se logra observar los resultados su purificación, en donde se observa que las fracciones de elución (carriles 6 – 15) aparece una banda entre los 25 y 37 kDa que corresponde con el peso deseado de 31.4 kDa, ahí mismo podemos observar que la proteína a diferencia de la obtenida con CusF3H+ muestra la presencia de otras bandas que no corresponden a la proteína de interés. De la misma manera se observa que toda la proteína se unió a la resina ya que no hay bandas en las fracciones de lavado. Las fracciones de elución se juntaron y se cuantificaron por BCA obteniendo 1.01 mg/mL un total 9.09 mg/L de expresión.

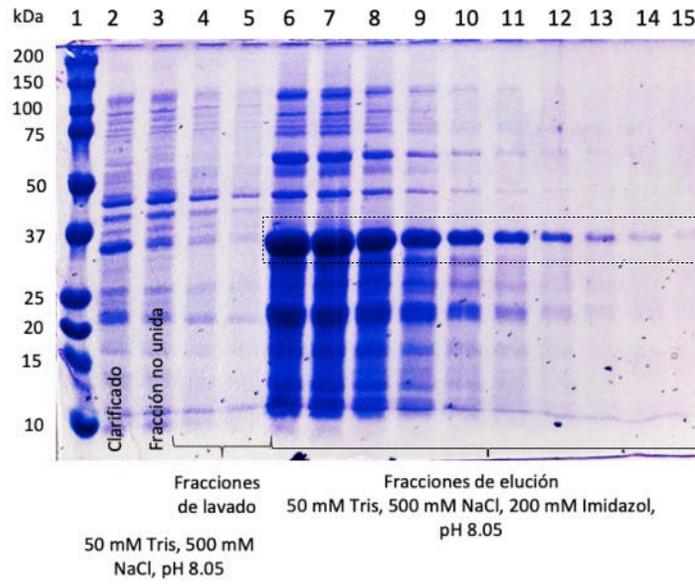


Figura 62. Análisis de fracciones de purificación IMAC de SmbP_Brazzein FLEX (31.4 kDa) por SDS-PAGE 12%. Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: lisado/clarificado, carril 3: percolado/fracción no unida, carriles 4 y 5: fracciones de lavado con 50 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 8.05, carriles 6 – 15: fracciones de elución de SmbP_Brazzein FLEX

5.31.2 CusF3H+_Hepcidin FLEX y SmbP_Hepcidin FLEX

La Figura 63 muestra el análisis de la purificación de CusF3H+_Hepcidin FLEX, sin embargo, no se logra observar la banda de la proteína en ninguno de los carriles, indicando que la proteína no se expresó.

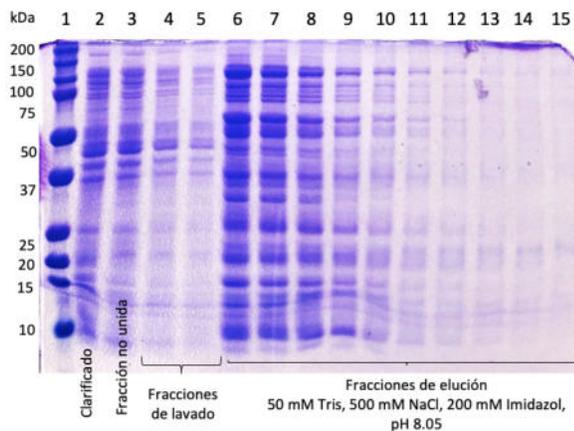


Figura 63. Análisis de fracciones de purificación IMAC de CusF3H+_Hepcidin FLEX (20.97 kDa) por SDS-PAGE 12%. Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: lisado/clarificado, carril 3: percolado/fracción no unida, carriles 4 – 7: fracciones de lavado con 50 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 8.05, carriles 8 – 15: fracciones de elución de CusF3H+_Hepcidin FLEX.

En la Figura 64 se logra observar los resultados de la purificación de SmbP_Hepcidin FLEX. A diferencia de la expresión con CusF3H+, en las fracciones de elución (carriles 7 – 14) se logra observar una banda entre los 20 y 25 kDa que corresponde con el peso esperado de 20.68 kDa. Las fracciones de elución se juntaron y se cuantificaron por BCA obteniendo 0.66 mg/mL un total de 2.64 mg/L de expresión de SmbP_Hepcidin FLEX.

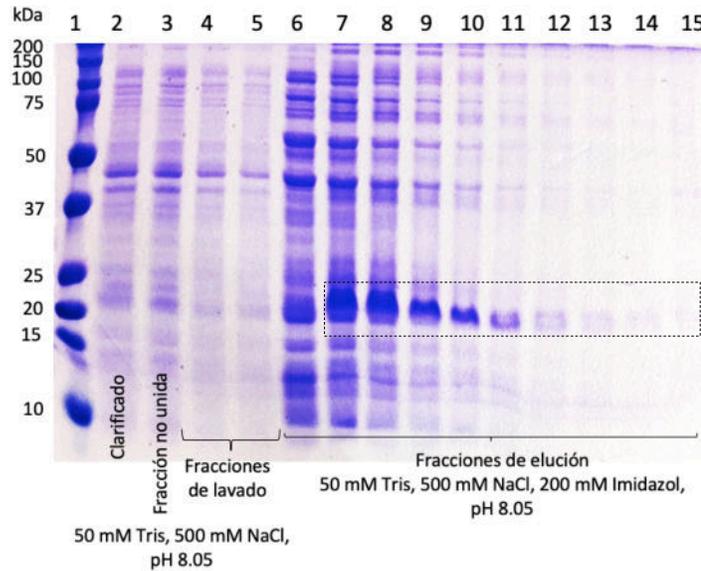


Figura 64. Análisis de fracciones de purificación IMAC de SmbP_Hepcidin FLEX (20.68 kDa) por SDS-PAGE 12%. Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: lisado/clarificado, carril 3: percolado/fracción no unida, carriles 4 y 5: fracciones de lavado con 50 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 8.05, carriles 6 – 15: fracciones de elución de SmbP_Hepcidin FLEX.

5.31.3 CusF3H+_Scygonadin FLEX y SmbP_Scygonadin FLEX

La Figura 65 muestra el análisis de la purificación de CusF3H+_Scygonadin FLEX (34.19 kDa) en donde se observa una alta concentración de proteína en las fracciones de elución (carriles 6-15) puesto que se observa una gran banda entre los 25 y 37 kDa que corresponde con el peso deseado de 34.19 kDa. Las fracciones de juntaron y se cuantificaron por BCA obteniendo 4.03 mg/mL de resina un total de 36.35 mg/L de expresión de CusF3H+_Scygonadin FLEX.

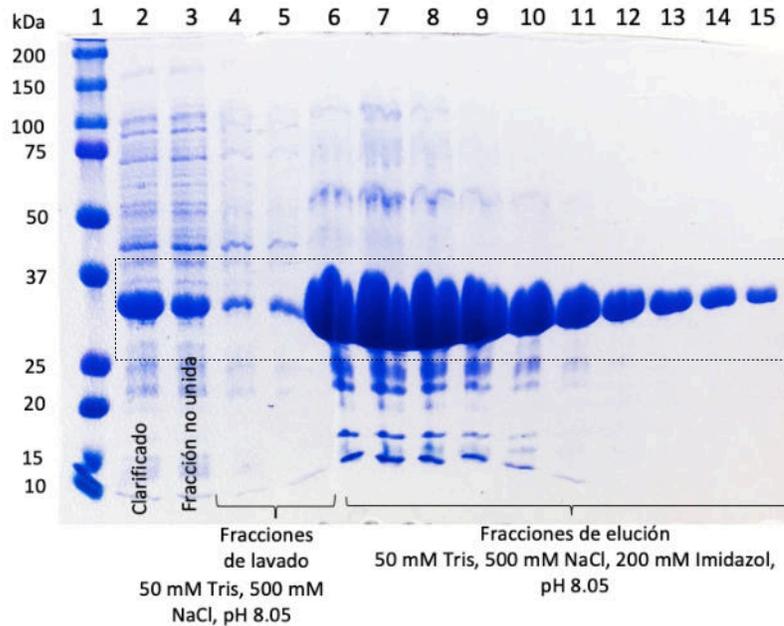


Figura 65. Análisis de fracciones de purificación IMAC de CusF3H+_Scygonadin FLEX (34.19 kDa) por SDS-PAGE 12%. Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: lisado/clarificado, carril 3: percolado/fracción no unida, carriles 4–7: fracciones de lavado con 50 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 8.05, carriles 8–15: fracciones de elución de CusF3H+_Scygonadin FLEX.

En las Figuras 66 y 67 se muestra el cromatograma de purificación y el análisis de las fracciones obtenidas de la purificación de SmbP_Scygonadin FLEX (33.9 kDa) respectivamente. En las fracciones de elución se logra observar una banda ancha de SmbP_Scygonadin FLEX que corresponde al peso deseado 33.9 kDa. También es posible observar que una gran parte de la muestra se pierde (carril 3) ya que no se unió a la resina y en comparación con CusF3H+_Scygonadin se logra observar una menor pérdida de proteína en las fracciones de lavado. Las fracciones de elución se juntaron y se cuantificaron por BCA obteniendo 6.05 mg de proteína por mL de resina un total de 42.35 mg/L de expresión de SmbP_Scygonadin FLEX.

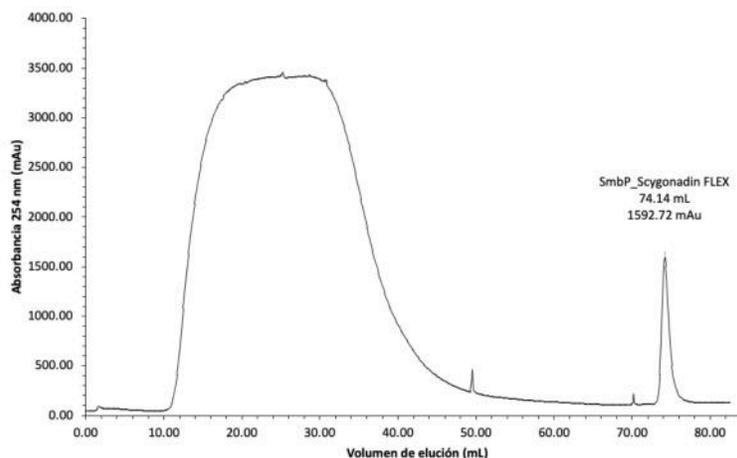


Figura 66. Cromatograma de purificación por afinidad a Ni(II) para SmbP_Scygonadin FLEX. Solución amortiguadora de lisis y lavado: 50 mM Tris, 500 mM NaCl, 5 mM imidazol, pH 8 y solución amortiguadora de elución: 50 mM Tris, 500 mM NaCl, 200 mM imidazol, pH 8.

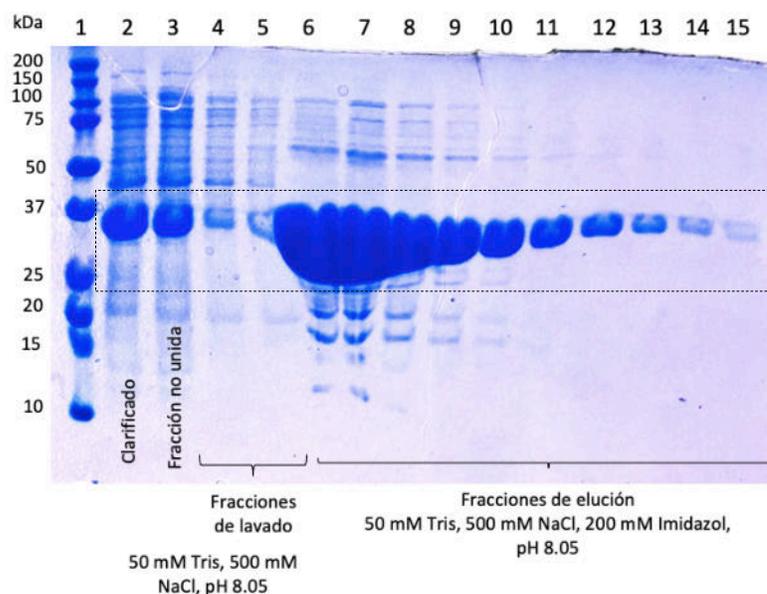


Figura 67. Análisis de fracciones de purificación IMAC de SmbP_Scygonadin FLEX (33.9 kDa) por SDS-PAGE 12%. Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: lisado/clarificado, carril 3: percolado/fracción no unida, carriles 4 y 5: fracciones de lavado con 50 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 8.05, carriles 6 – 15: fracciones de elución de SmbP_Scygnadin FLEX

5.32 Digestión con enteroquinasa y remoción del tag.

5.32.1 CusF3H+_Brazzein FLEX y SmbP_Brazzein FLEX

Para la digestión de CusF3H+_Brazzein FLEX con enteroquinasa se digirieron 2.22 mg de quimera con 6.4 μ L de enzima (3.2 μ L de enzima/mg de proteína); la reacción se llevó a cabo a 25 °C durante 16 horas. El proceso se replicó para SmbP_Brazzein FLEX en donde se digirieron 2.02 mg de quimera con 6.4 μ L de enzima. Al finalizar la reacción las muestras digeridas de CusF3H+_Brazzein FLEX y SmbP_Brazzein FLEX se purificaron con la resina HisPur Ni-NTA y las fracciones se analizaron por SDS-PAGE al 15%. Los resultados se presentan en las Figuras 68 y 69.

Como se puede observar (Figura 68) la digestión con enteroquinasa durante 16 horas no digirió por completo la quimera ya que se logra observar (carril 3) una banda entre los 25 y 37 kDa que corresponde a la quimera de 31.68 kDa. Brazzein FLEX se recolectó en la fracción no unida y en las fracciones de lavado (carriles 4 – 7) de acuerdo con el análisis por SDS-PAGE no hay presencia de otras proteínas en estos carriles por lo que se obtuvo Brazzein FLEX pura. En los carriles 8 -10 se logra observar la presencia de CusF3H+ como una banda sobre los 10 kDa.

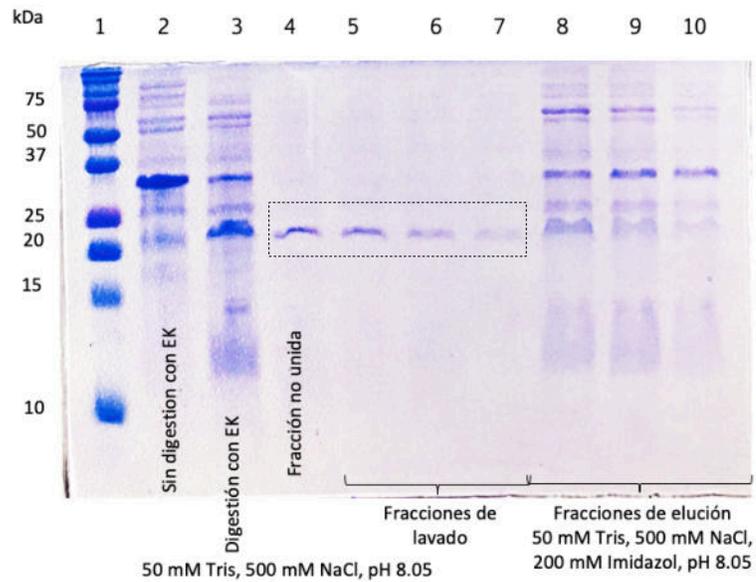


Figura 68. Reacción con enteroquinasa (EK) para la remoción del tag de CusF3H+_Brazzein FLEX (31.68 kDa). Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: CusF3H+_Brazzein FLEX (31.68 kDa) sin digerir, carril 3: CusF3H+ (10.15 kDa) + Brazzein FLEX (20.96 kDa) después de la digestión con enteroquinasa, carril 4: percolado/fracción no unida, carriles 5 – 7: fracciones de lavado, carriles 8 – 10: fracciones de elución.

Los resultados para fueron muy similares para la quimera con SmbP. La Figura 69 muestra la separación de SmbP (9.8 kDa) y brazzein FLEX (20.96 kDa); en donde igualmente se pudo recuperar la proteína de interés (Brazzein FLEX) en la fracción no unida y en las fracciones de lavado con un alto grado de pureza. En los carriles 8 -10 se logra observar la presencia de SmbP como una banda sobre los 10 kDa.

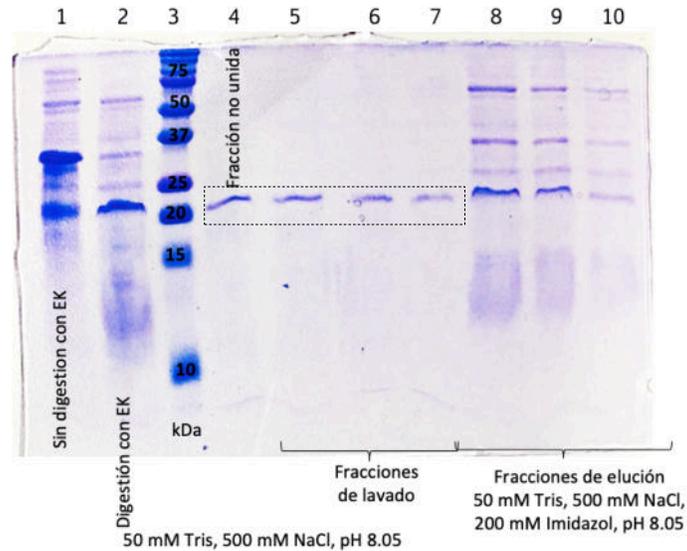


Figura 69. Reacción con enteroquinasa (EK) para la remoción del tag de SmbP_Brazzein FLEX (31.4 kDa). Carril 1: SmbP_Brazzein FLEX (31.4 kDa) sin digerir, carril 2: SmbP (9.8 kDa) + Brazzein FLEX (20.96 kDa) después de la digestión con enteroquinasa, carril 3: marcador de peso molecular, carril 4: percolado/fracción no unida, carriles 5 – 7: fracciones de lavado, carriles 8 – 10: fracciones de elución.

5.32.2 SmbP_Hepcidin FLEX

Para la digestión de SmbP_Hepcidin FLEX con enteroquinasa se digirieron 0.66 mg de quimera con 1.2 μ L de enzima (3.2 μ L de enzima/mg de proteína); la reacción se llevó a cabo a 25 $^{\circ}$ C durante 16 horas. Al finalizar la reacción la muestra digerida de SmbP_Hepcidin FLEX se purificaron con la resina HisPur Ni-NTA y las fracciones se analizaron por SDS-PAGE al 17%. Los resultados se presentan en la Figura 70.

En análisis mostró la presencia de una banda sobre los 25 kDa lo cual no corresponde con el peso de SmbP_Hepcidin FLEX que es de 20.68 kDa además vemos que no hay digestión de la quimera por lo que estos resultados se descartaron. Al no obtener Hepcidin FLEX en ninguna de las fracciones no se realizó análisis de actividad.

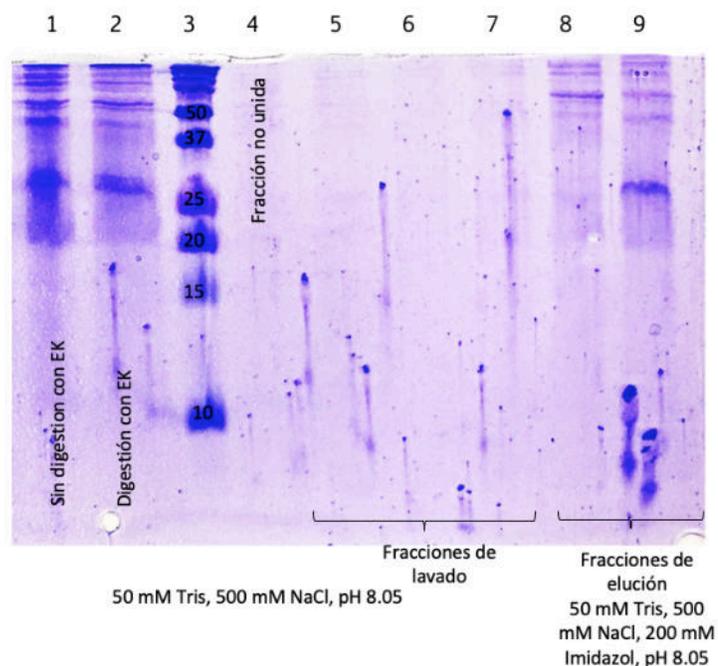


Figura 70. Reacción con enteroquinasa (EK) para la remoción del tag de SmbP_Hepcidin FLEX (20.68 kDa). Carril 1: SmbP_Hepcidin FLEX (20.68 kDa) sin digerir, carril 2: SmbP (9.8 kDa) + Hepcidin FLEX (10.24 kDa) después de la digestión con enteroquinasa, carril 3: marcador de peso molecular, carril 4: percolado/fracción no unida, carriles 5 – 7: fracciones de lavado, carriles 8 – 10: fracciones de elución.

5.32.3 CusF3H+_Scygonadin FLEX y SmbP_Scygonadin FLEX

Para la digestión de CusF3H+_Scygonadin FLEX con enteroquinasa se digirieron 1.95 mg de quimera con 7 μ L de enzima (3.2 μ L de enzima/mg de proteína); la reacción se llevó a cabo a 25 °C durante 16 horas. El proceso se replicó para SmbP_Scygonadin FLEX en donde se digirieron 2.89 mg de quimera con 9 μ L de enzima. Al finalizar la reacción las muestras digeridas de CusF3H+_Scygonadin FLEX y SmbP_Scygonadin FLEX se purificaron con la resina HisPur Ni-NTA y las fracciones se analizaron por SDS-PAGE al 15%. Los resultados se presentan en las Figuras 71 y 72.

Como se puede observar en la Figura 71 la digestión con enteroquinasa permitió la separación de CusF3H+ (10.15 kDa) y Scygonadin FLEX (23.47 kDa). Dado que CusF3H+ posee la habilidad de unirse a la resina, Scygonadin FLEX se pudo recuperar en la fracción no unida y en las fracciones de lavado. Aunque se logra observar en los carriles 8 – 10 que una parte de Scygonadin FLEX eluyó en esas fracciones al igual que la proteína de fusión CusF3H+.

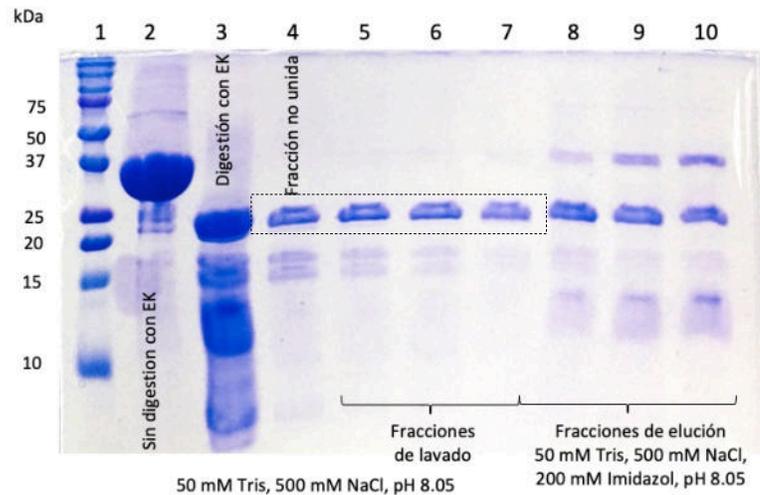


Figura 71. Reacción con enteroquinasa (EK) para la remoción del tag de CusF3H+_Scygonadin FLEX (34.19). Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: CusF3H+_Scygonadin FLEX (34.19 kDa) sin digerir, carril 3: CusF3H+ (10.15 kDa) + Scygonadin FLEX (23.47 kDa) después de la digestión con enteroquinasa, carril 4: percolado/fracción no unida, carriles 5 – 7: fracciones de lavado, carriles 8 – 10: fracciones de elución.

Los resultados para fueron muy similares para la quimera con SmbP. La Figura 72 muestra la separación de SmbP (9.8 kDa) y Scygonadin FLEX (23.37 kDa); en donde igualmente se pudo recuperar la proteína de interés en la fracción no unida y en las fracciones de lavado. En esta misma figura podemos observar que al igual que con CusF3H+ la proteína Scygonadin FLEX eluyó junto con SmbP.

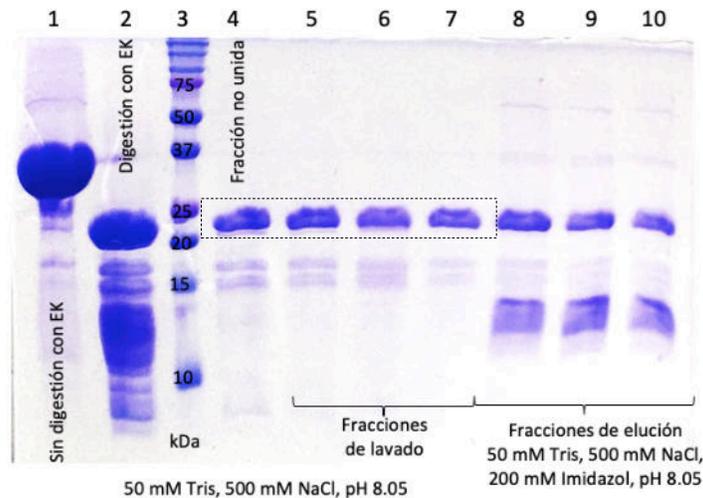


Figura 72. Reacción con enteroquinasa (EK) para la remoción del tag de SmbP_Scygonadin FLEX (33.9 kDa). Carril 1: SmbP_Scygonadin (33.9 kDa) sin digerir, carril 2: SmbP (9.8 kDa) + Scygonadin (23.47 kDa) después de la digestión con enteroquinasa, carril 3: marcador de peso molecular, carril 4: percolado/fracción no unida, carriles 5 – 7: fracciones de lavado, carriles 8 – 10: fracciones de elución.

5.33 Evaluación de la actividad de Scygonadin FLEX

Las fracciones que solo contenían la proteína Scygonadin FLEX que fueron obtenidas de su expresión con CusF3H+ y SmbP se dializaron por separado en 50 mM Tris, pH 8.05 y se evaluaron mediante un ensayo en placa (ensayo preliminar). Las placas con LB se sembraron con *E. coli* y *S. aureus* y a cada una se le añadieron discos de papel filtro con la proteína absorbida, las placas se incubaron a 37 °C durante 16 horas. Después de la incubación se analizaron las placas en busca de halos de inhibición. Los resultados no mostraron la presencia de halo.

La Scygonadin obtenida con SmbP se evaluó contra *S. aureus*, se utilizaron una serie de concentraciones del antimicrobiano (40, 20, 10, 5, and 2.5 μ M), el efecto antimicrobiano se observó a la concentración de 40 μ M.

A continuación, se muestra un resumen de las proteínas y péptidos reportados en este proyecto:

Tabla 28. Resumen de resultados reportados en el proyecto.

Proteína	Tag	Sistema de expresión	Método de purificación	Evaluación de actividad
Brazzein	CusF3H+	Como monómero en <i>E. coli</i> SHuffle	IMAC + AE	Sin actividad detectable.
	SmbP		IMAC + AE IMAC + SEC	Sin actividad detectable a una concentración de 0.147 mg/mL.
MCL	CusF3H+	Como monómero en <i>E. coli</i> SHuffle y Origami. Se expresó como cuerpos de inclusión.	N/A	N/A
	SmbP			
	PelB_SmbP			
	SmbP	Como monómero en <i>E. coli</i> SHuffle utilizando el medio Native Folder.	IMAC + AE	Sin actividad detectable a 0.150 mg/mL.
Scygonadin	CusF3H+	Como monómero en <i>E. coli</i> SHuffle	IMAC	N/A
	SmbP		IMAC	Actividad antimicrobiana a 4.23 μ M contra <i>S. aureus</i> .
	PelB_SmbP		N/A	N/A
Brazzein3XNG	CusF3H+	Como tándem de expresión en <i>E. coli</i> SHuffle. Con 3 repeticiones de brazzein separados por el sitio de hidroxilamina. Al observarse una mejor expresión con SmbP, se continuó solo con este sistema.	N/A	N/A
	SmbP		IMAC + AE	Sin actividad detectable a 0.450 mg/mL.
Rattusin2XNG	CusF3H+	Como tándem de expresión en <i>E. coli</i> SHuffle y Origami. Con 2 repeticiones de rattusin separados por el sitio de hidroxilamina. Se expresó como cuerpos de inclusión.	N/A	N/A
	SmbP			
Rattusin3XNG	CusF3H+	Como tándem de expresión en <i>E. coli</i> SHuffle y Origami. Con 3 repeticiones de rattusin separados por el sitio de hidroxilamina. Se expresó como cuerpos de inclusión.	N/A	N/A
	SmbP			

Proteína	Tag	Sistema de expresión	Método de purificación	Evaluación de actividad
Brazzein Flex	CusF3H+	Como tándem de expresión en <i>E. coli</i> SHuffle. Con 3 repeticiones de brazzein separadas cada una por una secuencia flexible (GGGGS) ₃ . En la microexpresión o se detectó expresión con PelB_SmbP.	IMAC	Sin actividad detectable.
	SmbP		IMAC	Sin actividad detectable a una concentración de 0.147 mg/mL.
	PelB_SmbP		N/A	N/A
Scygonadin FLEX	CusF3H+	Como tándem de expresión en <i>E. coli</i> SHuffle. Con 2 repeticiones de Scygonadin separadas cada una por una secuencia flexible (GGGGS) ₃ . Solo se continuó con el sistema SmbP.	IMAC	N/A
	SmbP		IMAC	Actividad antimicrobiana a 40 µM contra <i>S. aureus</i> .
	PelB_SmbP		N/A	N/A
Hepcidin FLEX	CusF3H+	Como tándem de expresión en <i>E. coli</i> SHuffle. Con 3 repeticiones de Hepcidin separadas cada una por una secuencia flexible (GGGGS) ₃ . En la microexpresión no se detectó expresión con PelB_SmbP.	IMAC, sin aparición de banda esperada.	N/A
	SmbP		IMAC, después de la remoción del tag, la banda no coincidió con el peso esperado.	N/A
	PelB_SmbP		N/A	N/A

IMAC: Cromatografía por afinidad a iones metálicos; AE: Cromatografía por Intercambio aniónico; SEC: Cromatografía de exclusión por tamaño.

CAPÍTULO 6

6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En este proyecto se propuso un sistema de expresión en el citoplasma de *Escherichia coli* de proteínas que contienen múltiples enlaces disulfuro y que se expresaron con la ayuda de las proteínas de fusión CusF3H+ y SmbP.

Utilizando la base de datos UNIPROT se obtuvo la secuencia de aminoácidos que codifican para la proteína Brazzein (UNIPROT P56552). De los 54 aminoácidos que la conforman se decidió tomar la forma menor que consta de 53 aminoácidos y que carece del ácido piroglutámico en su extremo N-terminal ya que esta forma ha demostrado un mayor poder edulcorante [15,44]. Además en la secuencia se respetaron los aminoácidos His30, Glu40 y Glu35 ya que en el 2015 Kwang-Hoon y colaboradores indicaron que estos aminoácidos son críticos para la dulzura de la proteína y que el aminoácido Gln16 es necesario para la integridad estructural de la proteína [45]. En el caso de Miraculin la secuencia se obtuvo de la misma base de datos (UNIPROT P13087) respetando los 121 aminoácidos que la conforman. La secuencia de Scygonadin y Hepcidin se obtuvieron de la base de datos DBAASP y se confirmaron con la base de datos UNIPROT las cuales están identificadas con los siguientes números de identificación DBAASP 8766 y UNIPROT Q5D710 para Scygonadin; DBAASP 2042 y UNIPROT Q8MJ80 para Hepcidin [28].

La secuencia de aminoácidos que codifica para todos los genes fue optimizada y sintetizada para su expresión en *E. coli*; ya que la optimización permite que la secuencia de ADN tenga los codones más comunes utilizados por el microorganismo hospedero y conlleva al aumento en los niveles de expresión de la proteína [46].

Una de las desventajas de *E. coli* es que aquellas proteínas que necesiten modificaciones post-traduccionales como la formación de puentes disulfuro se formarán como proteína insoluble, sobre todo si el ambiente en el que producen no es adecuado. Por lo anterior para la expresión de las proteínas se utilizó la cepa *E. coli* SHuffle. Ya que al tener inhibidas las vías de glutatión reductasa y tiorredoxina reductasa permite que el citoplasma mantenga un estado oxidado lo que propicia la formación de los enlaces disulfuro tal como lo probó Lobstein en el 2009 para las proteínas luciferasa y uroquinasa. Además, esta cepa al contar con la enzima disulfuro isomerasa DsbC mezcla los enlaces disulfuro mal oxidados permitiendo que la proteína en cuestión se plegue correctamente como en el caso de vtPA [5]. El uso de esta cepa es una ventaja, ya que al estar genéticamente modificada establece un ambiente favorable para aquellas proteínas que contienen enlaces disulfuro. De otra manera se tendría que llevar a cabo una co-expresión de las enzimas necesarias para la formación de los enlaces, tal y como lo probó Nguyen en el 2011 [3].

Por otra parte, se ha reportado que *E. coli* es incapaz de realizar modificaciones post-traduccionales como las N-glicosilaciones, lo que da a lugar a la formación de cuerpos de inclusión que tendrían que ser replegados de manera in vitro para poder obtener la proteína [47]. Miraculin posee 2 sitios de glicosilación, sin embargo, en el 2013 Takai y colaboradores reportaron que estas modificaciones no son esenciales para la actividad de la proteína, a diferencia de los puentes disulfuro los cuáles sí son necesarios para la actividad [20].

Tomando en cuenta los resultados obtenidos por Vargas-Cortez y colaboradores en el 2017, el uso CusF3H+ como proteína de fusión permite la obtención de proteína altamente soluble, facilita la etapa de purificación, permite una rápida remoción de la etiqueta de afinidad y aumenta los rendimientos de la proteína de interés[8]. La producción de proteína altamente soluble se puede observar en la Figura 13, carriles 5 y 7 para CusF3H+_Brazzein; y carriles 9 y 11 para CusF3H+_MCL en donde se aprecia una gran banda de expresión en la fracción soluble y prácticamente una nula formación de cuerpos de inclusión (carriles 6, 8, 10 y 12). La baja formación de cuerpos de inclusión se debe a varios factores; el principal es el uso de la proteína de fusión, sin embargo, esto también se debe a la temperatura de inducción de la proteína y a la optimización de la secuencia [5,48].

La Figura 15 muestra la primera purificación por afinidad a Ni(II) de CusF3H+_Brazzein, en donde el imidazol solo se utilizó en la solución amortiguadora de elución (200 mM) y en la que se puede notar que no hay pérdida de la proteína en el percolado y la fracción de lavado lo que indica que la proteína es altamente afín a la resina cargada con Ni(II), sin embargo se puede apreciar la unión de otras proteínas de *E. coli*. De ahí se decidió hacer una segunda purificación pero utilizando concentraciones de imidazol desde la lisis (5 mM), en el lavado (10 mM) ya que el imidazol compite con los sitios de coordinación presentes en el Ni(II) y desplaza a aquellas proteínas que no son tan afines al metal [8]. Es por lo que en la Figura 17 se logra apreciar la disminución de las proteínas contaminantes, sobre todo en las últimas fracciones de elución, obteniendo un % de pureza del 85% lo que es muy similar con los resultados de CusF3H+_GFP con un 74% de pureza [8].

Debido a que se pretende que la proteína Brazzein sea una alternativa de edulcorante natural para los humanos, la inocuidad de la proteína es necesaria; por lo que es de suma importancia la remoción de cualquier endotoxina que pueda estar presente. Tomando en cuenta lo anterior una de las técnicas cromatográficas más

empleadas para la remoción de endotoxinas es la cromatografía por intercambio aniónico ya que es una técnica de separación rápida y no requiere el uso de solventes. CusF3H+_Brazzein al tener una carga negativa compite con las endotoxinas por los sitios de unión, los cuales eventualmente se saturan. Aquellas proteínas que no interaccionan con la resina capturan a las endotoxinas y por lo tanto eluyen de la columna [49]. Una vez realizada esta técnica se pudo apreciar en el gel de poliacrilamida (Figura 19) la disminución de contaminantes proteínicos de entre los cuales se pudieron encontrar las endotoxinas.

Una dificultad que se presentó con esta proteína (CusF3H+_Brazzein) fue en la digestión con la enzima enteroquinasa, ya que no se lograba la digestión de la proteína, e incluso se llegó a observar la aparición varias bandas que no coincidían con el peso de SmbP ni de Brazzein (Figura 21). Aunque el sitio de reconocimiento de la enteroquinasa es DDDDK, se sabe que la enzima no exhibe alta rigurosidad en su especificidad para esta secuencia [50]. Lo que podría explicar que la digestión no se lleve al 100% y que haya aparición de otras bandas.

Con base en los resultados anteriores, se decidió probar con la proteína de fusión SmbP (Small metal-binding Protein) la cual, al igual que CusF3H+ posee capacidad de unión a iones Ni (II) y su bajo peso molecular (9.8 kDa) permite el aumento en los rendimientos de la proteína de interés [10]. La microexpresión de SmbP_Brazzein fue muy similar a la de CusF3H+_Brazzein, en donde toda la proteína se obtuvo en la fracción soluble. En la purificación se siguieron las mismas condiciones utilizadas con CusF3H+ en donde las soluciones amortiguadoras contenían 5 mM, 10 mM y 200 mM de imizadol para así aumentar la pureza en las fracciones de elución (Figura 24), obteniendo un 87% de pureza de la proteína y un rendimiento de 6.56 mg/mL. Estos resultados son muy parecidos a los que se obtuvieron en el 2010 por Hoog Kong y colaboradores quienes reportaron un rendimiento de 6.7 mg/L de Brazzein al expresarla en *E. coli* con PelB como péptido señal [15]. En este proyecto también se analizó la

expresión utilizando PelB como péptido señal, la construcción se realizó utilizando SmbP como proteína de fusión (PelB_SmbP). Es importante que la expresión con PelB_SmbP es favorable pero no se compara con la expresión citoplasmática de CusF3H+_Brazzein y SmbP_Brazzein.

Para separar Brazzein de la proteína de fusión SmbP se utilizaron dos técnicas, la primera fue una cromatografía de exclusión por tamaño, una técnica que además de separar ambas proteínas, permite la remoción de otras impurezas e indica la estructura cuaternaria que éstas pueden formar [51]. De acuerdo con los tamaños de ambas proteínas, SmbP de 9.8 kDa eluye primero ya que es más grande que Brazzein (6.37 kDa); las proteínas eluyeron a los 19.27 mL y 20.31 mL (Figura 25) respectivamente, lo que coincide con los volúmenes de elución esperados, ya que un estándar de Citocromo C (12.4 kDa), eluye a los 18.033 mL, por lo que se esperaba que SmbP y Brazzein eluyeran después de este volumen. En el caso de Brazzein se concluye que es un monómero de 6.37 kDa, lo que coincide con lo reportado en el 2016 por Neiers y colaboradores [52].

La segunda técnica fue la cromatografía por intercambio aniónico, que como se mencionó anteriormente es una técnica utilizada para remover endotoxinas, pero que además permite separar las proteínas de acuerdo a su punto isoeléctrico (pI) [49]. En este caso el pI de Brazzein es de 6.71 mientras que el de SmbP es de 6.11. Al estar en una solución de 50 mM Tris, pH 8 las proteínas se encuentran cargadas positivamente por lo que la adición de 50 mM Tris, 1 M NaCl desplaza las proteínas cuyo pI se encuentra más cercano al pH de la solución, es por eso que Brazzein eluye primero que SmbP [53].

Con base en los resultados de actividad de Brazzein, no fue posible detectar la actividad dulce similar a la dulzura de la sacarosa, pero si se percibió un sabor diferente. La falta de similitud con la dulzura de la sacarosa se puede deber a que 0.147 mg/mL de proteína solo representan una concentración de 0.02 mM de Brazzein. En el 2006, Berlec y colaboradores produjeron Brazzein en *E. coli* y determinaron que 0.1 mM de Brazzein

fue detectada por el panel y comparable a una solución de sacarosa entre 0.1 – 0.5 M [54]. De acuerdo con lo anterior se piensa que la actividad pudiera ser detectada si se obtuviera al menos 1 mg/mL de Brazzein.

En el caso de MCL, ésta fue expresada tanto en CusF3H+ como en SmbP, como ya se mencionó anteriormente en la Figura 13 (carriles 9 y 11) se obtuvo una banda de proteína soluble y del peso esperado (32.07 kDa). Sin embargo, en el proceso de purificación no se obtuvo la proteína. Analizando el SDS-PAGE (Figura 30) nos dimos cuenta de que la proteína no estaba presente desde el paso de la obtención del clarificado. Por lo anterior, se tomó una muestra de los restos celulares y se analizó por SDS-PAGE y fue ahí en donde se encontraba la proteína.

Cuando la proteína se localizó en los restos celulares, se pensó que podía deberse a una lisis insuficiente de la bacteria, por lo que se decidió utilizar una combinación de métodos para la lisis celular que incluyen la incubación con lisozima, la cual hidroliza la pared celular; y el Triton X-100, un detergente no-iónico que ayuda en la lisis celular, y un método físico como la lisis con perlas de vidrio [55,56]. A pesar de la combinación de estos métodos, la proteína permaneció en el residuo celular.

Otro método que se llevó a cabo para recuperar CusF3H+_MCL de los restos celulares fue aumentar la concentración de NaCl, ya que las proteínas son más estables en altas concentraciones de NaCl a 4 °C y continuando con la adición de tritón por lo mencionado anteriormente [57]. Nuevamente el resultado fue negativo como se puede apreciar en la Figura 32.

Cómo ultima opción se decidió llevar a cabo la extracción con detergentes iónicos. El sarcosil es un agente solubilizante que ayuda en el replegamiento de proteínas, la concentración más utilizada es de 0.3%, que fue la utilizada en este experimento. A parte del sarcosil, se agregó un surfactante switteriónico como el CHAPS, el cual

también es muy utilizado para solubilizar proteínas en una concentración de 1% del volumen total [58]. Al igual que con los otros métodos, la proteína sigue en los residuos celulares.

Estos resultados desfavorables indican que la proteína se encuentra como cuerpos de inclusión. Analizando los resultados de la microexpresión de CusF3H+_MCL parecía que la proteína se encontraba en la fracción soluble, esto se pudo deber a que la preparación de la muestra se llevó a cabo a 100°C por 10 minutos con buffer de carga que contiene SDS. Analizando la literatura se ha descrito que el SDS es un detergente que solubiliza y desnaturaliza las proteínas [58]. Todos los métodos anteriores también se probaron con SmbP_MCL sin embargo de igual manera los resultados fueron negativos.

El porqué de la expresión de CusF3H+_MCL como cuerpos de inclusión aún no se sabe. Por lo que se llegó a pensar que el sistema de expresión en *E. coli* SHuffle no estaba funcionando para esta proteína en particular. Se decidió utilizar otra cepa de *E. coli* que también tiene la capacidad de formar cuerpos de inclusión en el citoplasma: Origami2(DE3). Origami2(DE3) es una cepa de *E. coli* que está modificada genéticamente, la cual tiene inhibidas las vías de la glutatión y tiorredoxina reductasa y a diferencia de SHuffle, Origami no tiene la disulfuro isomerasa DsbC [59]. Para este experimento se utilizaron las condiciones para la extracción de MCL reportadas en el 2009 por Matsumaya y colaboradores, en donde el sedimento celular se incubaba con lisozima y después se lisaba por sonicación durante 16 minutos, en nuestro caso la lisis se hizo con perlas de vidrio durante 20 minutos, sin embargo no se logró la extracción de la proteína [60].

Al seguir obteniendo los resultados negativos se realizó una construcción con PelB_SmbP_MCL ya que de acuerdo con los resultados obtenidos por Pérez y colaboradores (2021) es posible expresar proteínas eucariotas con puentes disulfuro

utilizando el péptido PelB y la proteína de fusión SmbP y lo más importante obtenerlas en forma soluble [12]. Al analizar las microexpresiones de PelB_SmbP_MCL expresadas en BL21(DE3) mostraron una banda que coincidía con el peso esperado (32.07 kDa) lo que resultó ser positivo, sin embargo, al escalar la expresión a 500 mL la proteína permaneció en los restos celulares.

Finalmente se llevó la expresión en un nuevo medio de cultivo Native Folder™, es un medio de cultivo para bacterias que fue formulado especialmente para promover el plegamiento y la expresión de proteínas recombinantes solubles en *E. coli*. Este medio contiene compuestos que previenen la agregación y el mal plegamiento de las proteínas durante la expresión. Las especificaciones del medio consistían en un crecimiento a 37 °C hasta una DO₆₀₀ de 0.9, una vez alcanzada esta densidad óptica se bajó la temperatura a 20 °C y se continuó el crecimiento hasta una DO₆₀₀ 1.4; la inducción se llevó con 0.1 M IPTG a 20 °C por 16 horas. Después de la expresión las muestras se calentaron con buffer de carga a 95 °C por 5 minutos y se analizaron por SDS-PAGE. Dado los falsos positivos que se habían presentado anteriormente al calentar las muestras, se decidió tomar una muestra y lisarla con perlas de vidrio. Como se pudo apreciar en la Figura 35, CusF3H+_MCL y SmbP_MCL se expresan en este medio pero más importante se lograron obtener de forma soluble. Cabe mencionar que se obtiene una mayor cantidad de proteína soluble con SmbP.

Aunque no se conocen exactamente los componentes del medio de cultivo Native Folder™, se han reportado algunos aditivos para el plegamiento de las proteínas entre los cuales destacan: agentes caotrópicos como la urea o clorhidrato de guanidina en bajas concentraciones, aminoácidos como glicina, arginina y prolina, alcoholes polihídricos y azúcares como el polietilenglicol, glicerol, sorbitol y sacarosa, entre otros [61,62].

Al poder obtener SmbP_MCL de forma soluble se llevó a cabo la expresión, purificación y evaluación de la actividad de MCL. Antes de la evaluación de la actividad

de Miraculin, la proteína se dializó con una solución de 170 mM NaCl, ya que en el 2009 Matsumaya y colaboradores reportaron que MCL no es soluble en agua, lo que indica una inestabilidad estructural debido a la falta de glicosilaciones, además también reportaron que el NaCl a esa concentración no tiene un efecto en la actividad modificadora del sabor de MCL [60]. Al hacer el ensayo no se detectó actividad modificadora del sabor. Con los resultados obtenidos no se puede saber si esto se debe a la poca concentración de proteína, al sistema de expresión o a la falta de modificaciones post-traduccionales de la proteína.

Scygonadin ha sido previamente expresada en *E. coli* BL21(DE3) utilizando el vector de expresión pTRC-CKS y purificándola por IMAC en donde obtuvieron 97.5 mg/L de cultivo celular [29]. Sin embargo, no se menciona la formación de los enlaces disulfuro, ya que esta cepa de expresión no puede formarlos en el citoplasma. En este proyecto se obtuvieron casi 40 mg/L de SmbP_Scygonadin y 50 mg/L de CusF3H+_Scygonadin utilizando una columna de 1 mL, esto puede deberse a que la columna solo puede unir alrededor de 40 mg de proteína, por lo cual ésta se saturó. Esto se puede comprobar en las Figuras 42 y 44 en donde se puede apreciar que hay pérdida de la proteína en la fracción no unida y en las fracciones de lavado. Por lo tanto, el uso de una columna más grande pudiera aumentar la cantidad final de proteína. Este mismo sistema de expresión ha sido evaluado con otros péptidos catiónicos como SmbP_Bin1b (4.4 mg/L), SmbP_VpDef (5.28 mg/L), and SmbP_LL-37 (3.6 mg/L) [39–41] En este proyecto se obtuvo casi 10 veces más proteína (SmbP_Scygonadin) que los otros antimicrobianos lo cual puede deberse a la naturaleza de cada péptido.

El análisis de la actividad de Scygonadin obtenida con CusF3H+ y SmbP se realizó en dos partes. La primera con un análisis de inhibición del crecimiento con filtros embebidos con antimicrobiano y colocados en placas de Petri con LB y los microorganismos de prueba: *E. coli* y *S. aureus*; y la segunda prueba se realizó mediante el análisis de la concentración mínima inhibitoria (MIC) contra *S. aureus*. Con la primera prueba no se observó un halo de inhibición, pero cabe mencionar que la proteína

evaluada no era recién obtenida lo que pudo influir en los resultados. Se llevó a cabo un segundo lote de expresión y purificación de SmbP_Scygonadin y al obtener la proteína separada de la de fusión se realizó el análisis MIC, para esta prueba se utilizó una concentración inicial de 8 μM y a partir de ella se hicieron diluciones hasta una concentración final de 0.5 μM aproximadamente. El resultado de este experimento mostró inhibición de la actividad antimicrobiana de Scygonadin contra *S. aureus* a 4.23 μM , cabe mencionar que anteriormente se ha reportado actividad bactericida de Scygonadin contra *S. aureus* a una concentración entre 7.5 – 15 μM al ser expresada en *E. coli* por lo que en este proyecto se ha detectado el mismo efecto a una concentración mucho menor [29].

Varios factores pueden contribuir a este resultado; la influencia de la proteína de fusión en el plegamiento y la estabilidad es un aspecto crucial, donde los cambios pueden conducir a un plegamiento incorrecto, agregación o degradación proteolítica, impactando así la actividad biológica [63]. La ruptura proteolítica completa también es importante ya que la separación parcial del péptido de interés de la proteína de fusión produce una interferencia con la función del péptido o el enmascaramiento de su sitio de unión [64]. El procesamiento posterior, incluida la purificación, puede inducir estrés en el péptido, afectando su actividad [65].

Una de las estrategias para aumentar la cantidad de proteína es mediante tándems multiméricos, en donde una secuencia de interés se repite varias veces. En el caso de Brazzein se diseñó un tándem con 3 repeticiones de la secuencia y entre cada secuencia se colocaron los residuos N y G ya que son el sitio de reconocimiento de la hidroxilamina [66].

En el caso de los péptidos antimicrobianos ya se han reportado expresiones en forma de tándem, por ejemplo en el 2008 Zhou y colaboradores expresaron el péptido CM4 en *E. coli* con 3 repeticiones; en el 2006 Zhon y colaboradores expresaron en *E. coli* un tándem de 2 repeticiones con el péptido hBD2; Rao y colaboradores en el 2005 expresaron en *E. coli* el péptido hPAB- β con 3 repeticiones y en el 2004 Sun y

colaboradores el péptido Bin1B en *E. coli* con 2 repeticiones [31,67–69].

La expresión de los tándems es a prueba y error, un mayor número de repeticiones no garantiza una mayor expresión del péptido como lo reportó Zhon en el 2006 con el péptido hBD2 en donde un tándem de dos repeticiones del péptido se expresaba más que el péptido solo, pero menos que un tándem de tres y cuatro repeticiones [68]. Tomando en cuenta lo anterior, se diseñaron dos tándems de Rattusin, uno que contenía 2 repeticiones de la secuencia y otro con 3 repeticiones.

En el caso de Brazzein3xNG se pudo expresar y purificar, sin embargo, cuando se hizo la reacción con hidroxilamina no se lograba visualizar las bandas de cada proteína, por lo que se decidió evaluar su actividad en forma de tándem, sin embargo, al igual que el monómero evaluado anteriormente, no tuvo actividad.

Rattusin2xNG y Rattusin2xNG fueron incapaces de expresarse tanto en *E. coli* SHuffle como en Origami2(DE3), con las proteínas de fusión CusF3H+ y SmbP. Incluso se evaluaron diferentes condiciones de expresión (25 °C/16 horas, 37 °C/4 horas y 37°C/16 horas). Estas proteínas también se expresaron en *E. coli* BL21(DE3) con PelB_SmbP sin embargo no se observó expresión de los tándems.

La última estrategia de expresión consistió en el uso de uniones flexibles y tándems. Como se mencionó con anterioridad el uso de tándems multiméricos se utiliza para aumentar la cantidad de proteína traducida por los ribosomas, además el uso de uniones flexibles permite el plegamiento de cada monómero al disminuir la velocidad con la que se traduce cada proteína o péptido [21,36].

Brazzein es una proteína con la que se obtuvieron muy buenos resultados de expresión y purificación utilizando cualquiera de las estrategias antes mencionadas (expresión monomérica y por tándem con sitios NG) por lo que la expresión en tándem con uniones flexibles no fue la excepción. La Figura 58 mostró que efectivamente es posible obtener Brazzein FLEX con CusF3H+ y SmbP como proteínas de fusión y que además es posible expresarla a 17 °C y a 37 °C, sin embargo, los resultados se ven

favorecidos con SmbP.

En cuanto a la expresión de CusF3H+_Scygonadin FLEX y SmbP_Scygonadin FLEX las condiciones que favorecieron ambas expresiones fueron a bajas temperaturas (17°C) ya que como se ha mencionado anteriormente por Francis y colaboradores la disminución de la temperatura de expresión entre los 18 y 25 °C mejora la solubilidad de las proteínas recombinantes ya que las células disminuyen la velocidad con la que las proteínas están siendo traducidas [70]. Esta tendencia también se obtuvo al expresar Hecpidin FLEX (Figura 64) en donde la banda que representa su expresión es más intensa a esta temperatura al estar fusionada con SmbP.

Analizando los resultados de la purificación por tándems con uniones flexibles de CusF3H+_Scygonadin FLEX y SmbP_Scygonadin FLEX se obtuvieron 36.35 mg/L y 42.35 mg/L respectivamente, comparándolos con las expresiones de sus monómeros se obtuvo una concentración de proteína muy similar (CusF3H+_Scygonadin: 49.84 mg/L y SmbP Scygonadin: 38.38 mg/L). Cabe mencionar que, aunque las concentraciones son muy parecidas entre la proteína purificada como monómero y la purificada en tándem FLEX al separarlas los rendimientos son más altos para las construcciones FLEX.

Finalmente, se evaluó Scygonadin FLEX producida con SmbP como proteína de fusión. Al obtener la proteína separada de la de fusión se realizó el análisis MIC, la concentración inicial fue de 40 µM y a partir de ella se hicieron diluciones hasta una concentración final de 2.5 µM aproximadamente. El resultado de este experimento mostró inhibición de la actividad antimicrobiana de Scygonadin FLEX contra *S. aureus* a 40 µM, 10 veces más concentrada de Scygonadin. Incluso cuando se obtuvo más Scygonadin FLEX después de la purificación con IMAC se necesita una mayor concentración de esta para alcanzar la actividad antimicrobiana. Una MIC más alta observada en un péptido antimicrobiano dimérico en comparación con su homólogo monomérico puede atribuirse a varios mecanismos potenciales [71]. El aumento del tamaño del dímero puede impedir la penetración efectiva y la alteración de la membrana bacteriana, disminuyendo en última instancia su eficacia antimicrobiana.

Además, la estructura dimérica puede proteger a grupos funcionales cruciales responsables de la interacción con la membrana, como los residuos hidrofóbicos o catiónicos, reduciendo así su afinidad de unión a la membrana [72]. No existen reportes previos sobre la expresión de Scygonadin como una repetición en tándem utilizando secuencias flexibles y los efectos sobre su actividad antimicrobiana. Los resultados de este trabajo podrían ayudar a otros a decidir si la estrategia de repetición en tándem es el método adecuado para la producción de péptidos antimicrobianos, ya que aumenta la cantidad de proteína, pero disminuye un poco su actividad.

CAPÍTULO 7

7. CONCLUSIONES

- Se logró la construcción de los plásmidos con las proteínas de fusión CusF3H+, SmbP y PelB_SmbP y las proteínas de interés Brazzein, Miraculin, Scygonadin, Brazzein3xNG, Rattusin2xNg, Rattusin 3xNG, Brazzein FLEX, Scygonadin FLEX y Hpcidin FLEX.
- Se obtuvo la correcta expresión en *E. coli* de las proteínas CusF3H+_Brazzein y SmbP_Brazzein, puesto que se observa la aparición de nuevas bandas que corresponden al peso molecular deseado.
- Se logró la purificación de la proteína CusF3H+_Brazzein mediante cromatografía por afinidad a Ni(II), con 50 mM Tris, 500 mM NaCl, 5 mM imidazol como solución amortiguadora de lisis, 50 mM Tris, 500 mM NaCl, 10 mM imidazol como solución amortiguadora de lavado y 50 mM Tris, 500 mM NaCl, 200 mM imidazol como solución amortiguadora de elución.
- Se purificó la proteína CusF3H+_brazzein mediante cromatografía de intercambio aniónico, permitiendo la obtención de proteína altamente pura.
- No fue posible separar la proteína de fusión CusF3H+ de Brazzein
- Se logró la purificación de la proteína SmbP_Brazzein mediante cromatografía por afinidad a Ni(II), con 50 mM Tris, 500 mM NaCl, 5 mM imidazol como solución amortiguadora de lisis, 50 mM Tris, 500 mM NaCl, 10 mM imidazol como solución

amortiguadora de lavado y 50 mM Tris, 500 mM NaCl, 200 mM imidazol como solución amortiguadora de elución.

- Se separaron las proteínas SmbP y Brazzein mediante cromatografía de intercambio aniónico.
- No se detectó actividad dulce de Brazzein a una concentración de 0.02 mM.
- CusF3H+_MCL y SmbP_MCL se expresan como cuerpos de inclusión en *E. coli* SHuffle y en *E. coli* Origami2(DE3).
- No es posible recuperar SmbP_MCL expresándola con PelB como péptido señal en la cepa *E. coli* BL21(DE3).
- Es posible obtener proteína soluble de CusF3H+_MCL y SmbP_MCL solo si se expresa en el medio de cultivo Native Folder.
- No se detectó actividad modificadora del sabor de MCL a una concentración de 0.0065 mM.
- Se logró la purificación de las proteínas CusF3H+_Scygonadin y SmbP_Scygonadin mediante cromatografía por afinidad a Ni(II), con 50 mM Tris, 500 mM NaCl, pH. 8.05 como solución amortiguadora de lisis y de lavado y 50 mM Tris, 500 mM NaCl, 200 mM imidazol como solución amortiguadora de elución.
- La reacción con enteroquinasa permitió la separación de Scygonadin de ambas proteínas de fusión.
- No se detectó halo de inhibición con la proteína Scygonadin contra *E. coli* y *S. aureus*.
- Scygonadin expresada con SmbP mostró una actividad bactericida a una concentración de 4.23 μ M.
- Es posible expresar Brazzein en forma de tándem multimérico sin embargo no es posible separar los monómeros de Brazzein al digerir con hidroxilamina.
- Brazzein3X no tiene actividad si se evalúa como tándem multimérico.
- No es posible expresar los tándems multiméricos de Rattusin con ninguna de las dos proteínas de fusión ni en dos cepas diferentes de *E. coli*, ni utilizando el péptido señal PelB.

- La estrategia de tándems multiméricos con uniones flexibles evidenció que Brazzein FLEX se expresa correctamente tanto a 17°C como a 37°C. Sin embargo, las mejores condiciones son a 17°C expresándola con SmbP como proteína de fusión.
- No se detectó actividad dulce de Brazzein FLEX a una concentración de 0.147 mg/mL.
- Hepcidin FLEX se expresa a 17°C con ambas proteínas de fusión, pero a 37°C solo se expresa con SmbP.
- Scygonadin FLEX solo se expresa a 17°C con ambas proteínas de fusión, aunque la mejor expresión se da con SmbP.
- Scygonadin FLEX no mostró halo de inhibición al evaluarse contra *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.
- Scygonadin FLEX expresada con SmbP mostró una actividad bactericida a una concentración de 40 µM.
- Aunque no se obtuvo actividad de todas las proteínas expresadas y purificadas en este proyecto, se acepta la hipótesis de que el uso de CusF3H+ y SmbP como proteínas de fusión aumentan la solubilidad y facilitan el proceso de purificación de proteínas recombinantes con enlaces disulfuro expresadas en el citoplasma de *Escherichia coli*.

CAPÍTULO 8

8. PERSPECTIVAS

Dentro de las perspectivas de este proyecto se sugiere volver a producir las proteínas para evaluar nuevamente la actividad de cada una.

Otra de las perspectivas es comenzar con la expresión utilizando las fermentaciones FED-BATCH o la fermentación continua para aumentar la biomasa y por lo tanto aumentar la concentración de proteínas.

En el caso de las proteínas dulces, sería interesante utilizar otros hospederos como *Bacillus subtilis* el cual forma parte de la lista GRAS o incluso el uso de levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris*.

Finalmente, para los péptidos antimicrobianos se sugiere evaluar contra otras bacterias patógenas como todo el grupo ESKAPE, además de bacterias resistentes aisladas de ambientes clínicos.

Referencias Bibliográficas

1. Messens, J.; Collet, J.-F. Pathways of Disulfide Bond Formation in *Escherichia coli*. *Ijbc* **2006**, *38*, 1050–1062, doi:10.1016/j.biocel.2005.12.011.
2. Sato, Y.; Inaba, K. Disulfide Bond Formation Network in the Three Biological Kingdoms, Bacteria, Fungi and Mammals. *FEBS Journal* **2012**, *279*, 2262–2271, doi:10.1111/j.1742-4658.2012.08593.x.
3. Nguyen, V.D.; Hatahet, F.; Salo, K.E.H.; Enlund, E.; Zhang, C.; Ruddock, L.W. Pre-Expression of a Sulfhydryl Oxidase Significantly Increases the Yields of Eukaryotic Disulfide Bond Containing Proteins Expressed in the Cytoplasm of *E. coli*. *Microb Cell Fact* **2011**, *10*, 1–13, doi:10.1186/1475-2859-10-1.
4. de Marco, A. Strategies for Successful Recombinant Expression of Disulfide Bond-Dependent Proteins in *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact* **2009**, *8*, 26, doi:10.1186/1475-2859-8-26.
5. Lobstein, J.; Emrich, C.A.; Jeans, C.; Faulkner, M.; Riggs, P.; Berkmen, M. SHuffle, a Novel *Escherichia coli* Protein Expression Strain Capable of Correctly Folding Disulfide Bonded Proteins in Its Cytoplasm. *Microb Cell Fact* **2012**, *11*, 1, doi:10.1186/1475-2859-11-56.
6. Hatahet, F.; Nguyen, V.D.; Salo, K.E.H.; Ruddock, L.W. Disruption of Reducing Pathways Is Not Essential for Efficient Disulfide Bond Formation in the Cytoplasm of *E. coli*. *Microb Cell Fact* **2010**, *9*, 67, doi:10.1186/1475-2859-9-67.
7. Cantu-Bustos, J.E.; Vargas-Cortez, T.; Morones-Ramirez, J.R.; Balderas-Renteria, I.; Galbraith, D.W.; McEvoy, M.M.; Zarate, X. Expression and Purification of Recombinant Proteins in *Escherichia coli* Tagged with the Metal-Binding Protein CusF. *Protein Expr Purif* **2016**, *121*, 61–65, doi:10.1016/j.pep.2016.01.007.
8. Vargas-Cortez, T.; Morones-Ramirez, J.R.; Balderas-Renteria, I.; Zarate, X. Production of Recombinant Proteins in *Escherichia coli* Tagged with the Fusion Protein CusF3H+. *Protein Expr Purif* **2017**, *132*, 44–49, doi:10.1016/j.pep.2017.01.006.
9. Barney, B.M.; Lobrutto, R.; Francisco, W.A. Characterization of a Small Metal Binding Protein from *Nitrosomonas europaea*. *Biochemistry* **2004**, *43*, 11206–11213.
10. Vargas-Cortez, T.; Morones-Ramirez, J.R.; Balderas-Renteria, I.; Zarate, X. Expression and Purification of Recombinant Proteins in *Escherichia coli* Tagged with a Small Metal-Binding Protein from *Nitrosomonas europaea*. *Protein Expr Purif* **2016**, *118*, 49–54, doi:10.1016/j.pep.2015.10.009.
11. Santos, B.D.; Morones-Ramirez, J.R.; Balderas-Renteria, I.; Casillas-Vega, N.G.; Galbraith, D.W.; Zarate, X. Optimizing Periplasmic Expression in *Escherichia coli* for the Production of Recombinant Proteins Tagged with the Small Metal-Binding Protein SmbP. *Mol Biotechnol* **2019**, *61*, 451–460, doi:10.1007/s12033-019-00176-4.
12. Perez-Perez, D.A.; Pioquinto-Avila, E.; Arredondo-Espinoza, E.; Morones-Ramirez, J.R.; Balderas-Renteria, I.; Zarate, X. Engineered Small Metal-Binding Protein Tag Improves the Production of Recombinant Human Growth Hormone in the Periplasm of *Escherichia coli*. *FEBS Open Bio* **2020**, *10*, 546–551, doi:10.1002/2211-5463.12808.

13. Assadi-Porter, F.M.; Patry, S.; Markley, J.L. Efficient and Rapid Protein Expression and Purification of Small High Disulfide Containing Sweet Protein Brazzein in *E. coli*. *Protein Expr Purif* **2008**, *58*, 263–268, doi:10.1016/j.pep.2007.11.009.
14. Jo, H.J.; Noh, J.S.; Kong, K.H. Efficient Secretory Expression of the Sweet-Tasting Protein Brazzein in the Yeast *Kluyveromyces lactis*. *Protein Expr Purif* **2013**, *90*, 84–89, doi:10.1016/j.pep.2013.05.001.
15. Lee, J.J.; Kong, J.N.; Do, H.D.; Jo, D.H.; Kong, K.H. Design and Efficient Soluble Expression of a Sweet Protein, Brazzein and Minor-Form Mutant. *Bull Korean Chem Soc* **2010**, *31*, 3830–3833, doi:10.5012/bkcs.2010.31.12.3830.
16. Yoon, S.Y.; Kong, J.N.; Jo, D.H.; Kong, K.H. Residue Mutations in the Sweetness Loops for the Sweet-Tasting Protein Brazzein. *Food Chem* **2011**, *129*, 1327–1330, doi:10.1016/j.foodchem.2011.06.054.
17. Assadi-Porter, F.M.; Maillet, E.L.; Radek, J.T.; Quijada, J.; Markley, J.L.; Max, M. Key Amino Acid Residues Involved in Multi-Point Binding Interactions between Brazzein, a Sweet Protein, and the T1R2-T1R3 Human Sweet Receptor. *J Mol Biol* **2010**, *398*, 584–599, doi:10.1016/j.jmb.2010.03.017.
18. He, Z.; Tan, J.S.; Lai, O.M.; Ariff, A.B. Optimization of Conditions for the Single Step IMAC Purification of Miraculin from *Synsepalum dulcificum*. *Food Chem* **2015**, *181*, 19–24, doi:10.1016/j.foodchem.2014.11.166.
19. Hirai, T.; Sato, M.; Toyooka, K.; Sun, H.J.; Yano, M.; Ezura, H. Miraculin, a Taste-Modifying Protein Is Secreted into Intercellular Spaces in Plant Cells. *J Plant Physiol* **2010**, *167*, 209–215, doi:10.1016/j.jplph.2009.08.001.
20. Takai, A.; Satoh, M.; Matsuyama, T.; Ito, A.; Nakata, R.; Aoyama, T.; Inoue, H. Secretion of Miraculin through the Function of a Signal Peptide Conserved in the Kunitz-Type Soybean Trypsin Inhibitor Family. *FEBS Lett* **2013**, *587*, 1767–1772, doi:10.1016/j.febslet.2013.04.026.
21. Deng, T.; Ge, H.; He, H.; Liu, Y.; Zhai, C.; Feng, L.; Yi, L. The Heterologous Expression Strategies of Antimicrobial Peptides in Microbial Systems. *Protein Expr Purif* **2017**, *140*, 52–59, doi:10.1016/j.pep.2017.08.003.
22. Li, Y. Recombinant Production of Antimicrobial Peptides in *Escherichia coli*: A Review. *Protein Expr Purif* **2011**, *80*, 260–267, doi:10.1016/j.pep.2011.08.001.
23. Ji, S.; Yun, H.; Park, G.; Min, H.J.; Lee, C.W. Expression and Characterization of Recombinant Rattusin, an α -Defensin-Related Peptide with a Homodimeric Scaffold Formed by Intermolecular Disulfide Exchanges. *Protein Expr Purif* **2018**, *147*, 17–21, doi:10.1016/j.pep.2018.02.006.
24. Patil, A.A.; Ouellette, A.J.; Lu, W.; Zhang, G. Rattusin, an Intestinal α -Defensin-Related Peptide in Rats with a Unique Cysteine Spacing Pattern and Salt-Insensitive Antibacterial Activities. *Antimicrob Agents Chemother* **2013**, *57*, 1823–1831, doi:10.1128/AAC.02237-12.
25. Boumaiza, M.; Jaouen, M.; Deschemin, J.C.; Ezzine, A.; Khalaf, N. Ben; Vaultont, S.; Marzouki, M.N.; Sari, M.A. Expression and Purification of a New Recombinant Camel Hepcidin Able to Promote the Degradation of the Iron Exporter Ferroportin1. *Protein Expr Purif* **2015**, *115*, 11–18, doi:10.1016/j.pep.2015.04.016.

26. Liu, Q.-N.; Xin, Z.-Z.; Zhang, D.-Z.; Jiang, S.-H.; Chai, X.-Y.; Wang, Z.-F.; Li, C.-F.; Zhou, C.-L.; Tang, B.-P. CDNA Cloning and Expression Analysis of a Hecpidin Gene from Yellow Catfish *Pelteobagrus fulvidraco* (Siluriformes: Bagridae). *Fish Shellfish Immunol* **2016**, *60*, 247–254, doi:10.1016/j.fsi.2016.10.049.
27. Srinivasulu, B.; Syvitski, R.; Seo, J.K.; Mattatall, N.R.; Knickle, L.C.; Douglas, S.E. Expression, Purification and Structural Characterization of Recombinant Hecpidin, an Antimicrobial Peptide Identified in Japanese Flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Protein Expr Purif* **2008**, *61*, 36–44, doi:10.1016/j.pep.2008.05.012.
28. Pirtskhalava, M.; Armstrong, A.A.; Grigolava, M.; Chubinidze, M.; Alimbarashvili, E.; Vishnepolsky, B.; Gabrielian, A.; Rosenthal, A.; Hurt, D.E.; Tartakovsky, M. DBAASP v3: Database of Antimicrobial/Cytotoxic Activity and Structure of Peptides as a Resource for Development of New Therapeutics. *Nucleic Acids Res* **2021**, *49*, D288–D297, doi:10.1093/nar/gkaa991.
29. Peng, H.; Yang, M.; Huang, W.S.; Ding, J.; Qu, H.D.; Cai, J.J.; Zhang, N.; Wang, K.J. Soluble Expression and Purification of a Crab Antimicrobial Peptide Scygonadin in Different Expression Plasmids and Analysis of Its Antimicrobial Activity. *Protein Expr Purif* **2010**, *70*, 109–115, doi:10.1016/j.pep.2009.09.008.
30. Feng, J.; Jie, L.; Zhen, Z. SUMO Mediating Fusion Expression of Antimicrobial Peptide CM4 from Two Joined Genes in *Escherichia coli*. **2011**, 296–300, doi:10.1007/s00284-010-9705-3.
31. Sun, X.-J.; Wang, D.-N.; Zhang, W.-J.; Wu, X.-F. Expression of an Antimicrobial Peptide Identified in the Male Reproductive System of Rats. *Mol Biotechnol* **2004**, *28*, 185–189, doi:10.1385/MB:28:3:185.
32. Dong, B.; Cheng, R.Q.; Liu, Q.Y.; Wang, J.; Fan, Z.C. Multimer of the Antimicrobial Peptide Mytichitin-A Expressed in *Chlamydomonas reinhardtii* Exerts a Broader Antibacterial Spectrum and Increased Potency. *J Biosci Bioeng* **2018**, *125*, 175–179, doi:10.1016/j.jbiosc.2017.08.021.
33. Barrett, Alexander S.; Wither, Matthew J.; Hill, Ryan C.; Dzieciatkowska, Monika; D’Alessandro, Angelo; Reisz, Julie A.; Hansen, K.C. Hydroxylamine Chemical Digestion for Insoluble Extracellular Matrix Characterization. *J. Proteome Res.* **2018**, *176*, 139–148, doi:10.1021/acs.jproteome.7b00527.Hydroxylamine.
34. Trinh, R.; Gurbaxani, B.; Morrison, S.L.; Seyfzadeh, M. Optimization of Codon Pair Use within the (GGGG) “3 Linker Sequence Results in Enhanced Protein Expression. *Mol Immunol* **2004**, *40*, 717–722, doi:10.1016/j.molimm.2003.08.006.
35. Argos, P. An Investigation of Oligopeptides Linking Domains in Protein Tertiary Structures and Possible Candidates for General Gene Fusion. *J Mol Biol* **1990**, *211*, 943–958, doi:10.1016/0022-2836(90)90085-Z.
36. Chen, X.; Zaro, J.L.; Shen, W.C. Fusion Protein Linkers: Property, Design and Functionality. *Adv Drug Deliv Rev* **2013**, *65*, 1357–1369, doi:10.1016/j.addr.2012.09.039.
37. Kurokawa, N.; Hirai, T.; Takayama, M.; Hiwasa-Tanase, K.; Ezura, H. An E8 Promoter-HSP Terminator Cassette Promotes the High-Level Accumulation of Recombinant Protein Predominantly in Transgenic Tomato Fruits: A Case Study of Miraculin. *Plant Cell Rep* **2013**, *32*, 529–536, doi:10.1007/s00299-013-1384-7.

38. Boumaiza, M.; Chahed, H.; Ezzine, A.; Jaouan, M.; Gianoncelli, A.; Longhi, G.; Carmona, F.; Arosio, P.; Sari, M.-A.; Marzouki, M.N. Recombinant Overexpression of Camel Hepcidin CDNA in *Pichia Pastoris*: Purification and Characterization of the PolyHis-Tagged Peptide HepcD-His. *Journal of Molecular Recognition* **2017**, *30*, e2561, doi:10.1002/jmr.2561.
39. Montfort-Gardeazabal, J.M.; Claudio, P.C.M.-S.; Casillas-Vega, N.G.; Zarate, X. Expression and Purification of the VpDef Defensin in *Escherichia coli* Using the Small Metal-Binding Proteins CusF3H⁺ and SmbP. *Protein Pept Lett* **2020**, *28*, 108–114, doi:10.2174/0929866527666200610133407.
40. Montfort-Gardeazabal, J.M.; Balderas-Renteria, I.; Casillas-Vega, N.G.; Zarate, X. Expression and Purification of the Antimicrobial Peptide Bin1b in *Escherichia coli* Tagged with the Fusion Proteins CusF3H⁺ and SmbP. *Protein Expr Purif* **2021**, *178*, 105784, doi:10.1016/j.pep.2020.105784.
41. Perez-Perez, D.A.; Villanueva-Ramirez, T. de J.; Hernandez-Pedraza, A.E.; Casillas-Vega, N.G.; Gonzalez-Barranco, P.; Zarate, X. The Small Metal-Binding Protein Smbp Simplifies the Recombinant Expression and Purification of the Antimicrobial Peptide Ll-37. *Antibiotics* **2021**, *10*, doi:10.3390/antibiotics10101271.
42. Faus, I.; Sisniega, H. Sweet-tasting Proteins. *Biopolymers Online* **2005**, 203–210.
43. Bahar, A.A.; Ren, D. Antimicrobial Peptides. *Pharmaceuticals* **2013**, *6*, 1543–1575, doi:10.3390/ph6121543.
44. Assadi-Porter, F.M.; Aceti, D.J.; Cheng, H.; Markley, J.L. Efficient Production of Recombinant Brazzein, a Small, Heat-Stable, Sweet-Tasting Protein of Plant Origin. *Arch Biochem Biophys* **2000**, *376*, 252–258, doi:10.1006/abbi.2000.1725.
45. Lim, J.K.; Jang, J.C.; Kong, J.N.; Kim, M.C.; Kong, K.H. Importance of Glu53 in the C-Terminal Region of Brazzein, a Sweet-Tasting Protein. *J Sci Food Agric* **2016**, *96*, 3202–3206, doi:10.1002/jsfa.7501.
46. Hannig, G.; Makrides, S.C. Strategies for Optimizing Heterologous Protein Expression in *Escherichia Coli*. *Trends Biotechnol* **1998**, *16*, 54–60, doi:10.1016/S0167-7799(97)01155-4.
47. Walsh, G.; Jefferis, R. Post-Translational Modifications in the Context of Therapeutic Proteins. *Nat Biotechnol* **2006**, *24*, 1241–1252, doi:10.1038/nbt1252.
48. Rosano, G.L.; Ceccarelli, E.A. Recombinant Protein Expression in *Escherichia coli*: Advances and Challenges. *Front Microbiol* **2014**, *5*, 1–17, doi:10.3389/fmicb.2014.00172.
49. Ongkudon, C.M.; Chew, J.H.; Liu, B.; Danquah, M.K. Chromatographic Removal of Endotoxins: A Bioprocess Engineer's Perspective. *ISRN Chromatography* **2012**, *2012*, 1–9, doi:10.5402/2012/649746.
50. Shahravan, S.H.; Qu, X.; Chan, I.S.; Shin, J.A. Enhancing the Specificity of the Enterokinase Cleavage Reaction to Promote Efficient Cleavage of a Fusion Tag. *Protein Expr Purif* **2008**, *59*, 314–319, doi:10.1016/j.pep.2008.02.015.
51. Hong, P.; Koza, S.; Bouvier, E.S.P. Size-Exclusion Chromatography for the Analysis of Protein Biotherapeutics and Their Aggregates. *J Liq Chromatogr Relat Technol* **2012**, *35*, 2923–2950, doi:10.1080/10826076.2012.743724.

52. Neiers, F.; Naumer, C.; Krohn, M.; Briand, L. The Recent Development of a Sweet-Tasting Brazzein and Its Potential Industrial Applications. **2018**, 527–546, doi:10.1007/978-3-319-27027-2_2.
53. Jungbauer, A.; Hahn, R. *Ion-Exchange Chromatography*; 1st ed.; Elsevier Inc., 2009; Vol. 463;.
54. Berlec, A.; Jevnikar, Z.; Majhenič, A.Č.; Rogelj, I.; Štrukelj, B. Expression of the Sweet-Tasting Plant Protein Brazzein in *Escherichia coli* and *Lactococcus lactis*: A Path toward Sweet Lactic Acid Bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* **2006**, *73*, 158–165, doi:10.1007/s00253-006-0438-y.
55. Grabski, A.C. *Advances in Preparation of Biological Extracts for Protein Purification*; 1st ed.; Elsevier Inc., 2009; Vol. 463;.
56. Islam, M.S.; Aryasomayajula, A.; Selvaganapathy, P.R. A Review on Macroscale and Microscale Cell Lysis Methods. *Micromachines (Basel)* **2017**, *8*, 1–27, doi:10.3390/mi8030083.
57. Linn, S. *Strategies and Considerations for Protein Purifications*; 1st ed.; Elsevier Inc., 2009; Vol. 463;.
58. Burgess, R.R. *Refolding Solubilized Inclusion Body Proteins*; 1st ed.; Elsevier Inc., 2009; Vol. 463;.
59. Long, X.; Gou, Y.; Luo, M.; Zhang, S.; Zhang, H.; Bai, L.; Wu, S.; He, Q.; Chen, K.; Huang, A.; et al. Soluble Expression , Purification , and Characterization of Active Recombinant Human Tissue Plasminogen Activator by Auto-Induction in *E . coli*. **2015**, 1–9, doi:10.1186/s12896-015-0127-y.
60. Matsuyama, T.; Satoh, M.; Nakata, R.; Aoyama, T.; Inoue, H. Functional Expression of Miraculin, a Taste-Modifying Protein in *Escherichia coli*. *J Biochem* **2009**, *145*, 445–450, doi:10.1093/jb/mvn184.
61. Tsumoto, K.; Umetsu, M.; Kumagai, I.; Ejima, D.; Philo, J.S.; Arakawa, T. Role of Arginine in Protein Refolding, Solubilization, and Purification. *Biotechnol Prog* **2004**, *20*, 1301–1308.
62. Singh, A.; Upadhyay, V.; Upadhyay, A.K.; Singh, S.M.; Panda, A.K. Protein Recovery from Inclusion Bodies of *Escherichia coli* Using Mild Solubilization Process. **2015**, 1–10, doi:10.1186/s12934-015-0222-8.
63. Raran-Kurussi, S.; Waugh, D.S. Unrelated Solubility-Enhancing Fusion Partners MBP and NusA Utilize a Similar Mode of Action. *Biotechnol Bioeng* **2014**, *111*, 2407–2411, doi:10.1002/bit.25317.
64. Sequeira, A.F.; Turchetto, J.; Saez, N.J.; Peysson, F.; Ramond, L.; Duhoo, Y.; Blémont, M.; Fernandes, V.O.; Gama, L.T.; Ferreira, L.M.A.; et al. Gene Design, Fusion Technology and TEV Cleavage Conditions Influence the Purification of Oxidized Disulphide-Rich Venom Peptides in *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact* **2017**, *16*, doi:10.1186/s12934-016-0618-0.
65. Wen, Q.; Zhang, L.; Zhao, F.; Chen, Y.; Su, Y.; Zhang, X.; Chen, P.; Zheng, T. Production Technology and Functionality of Bioactive Peptides. *Functionality of Bioactive Peptides* **2023**, *29*, 652–674, doi:10.2174/1381612829666230201121353. PMID: 36725828.

66. Park, H.; Pyo, S.; Hong, S.; Kim, J. Optimization of the Hydroxylamine Cleavage of an Expressed Fusion Protein. **2003**, 1–8.
67. Zhou, L.; Zhao, Z.; Li, B.; Cai, Y.; Zhang, S. TrxA Mediating Fusion Expression of Antimicrobial Peptide CM4 from Multiple Joined Genes in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* **2009**, *64*, 225–230, doi:10.1016/j.pep.2008.11.006.
68. Zhong, Z.; Xu, Z.; Peng, L.; Huang, L.; Fang, X.; Cen, P. Tandem Repeat MhBD2 Gene Enhance the Soluble Fusion Expression of HBD2 in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* **2006**, *71*, 661–667, doi:10.1007/s00253-005-0212-6.
69. Rao, X.; Hu, J.; Li, S.; Jin, X.; Zhang, C.; Cong, Y.; Hu, X.; Tan, Y.; Huang, J.; Chen, Z.; et al. Design and Expression of Peptide Antibiotic hPAB-β As Tandem Multimers in *Escherichia coli*. *Peptides (N.Y.)* **2005**, *26*, 721–729, doi:10.1016/j.peptides.2004.12.016.
70. Francis, D.M.; Page, R. Strategies to Optimize Protein Expression in *E. coli*. *Curr Protoc Protein Sci* **2010**, 1–29, doi:10.1002/0471140864.ps0524s61.
71. Lorenzón, E.N.; Cespedes, G.F.; Vicente, E.F.; Nogueira, L.G.; Bauab, T.M.; Castro, M.S.; Cilli, E.M. Effects of Dimerization on the Structure and Biological Activity of Antimicrobial Peptide Ctx-Ha. *Antimicrob Agents Chemother* **2012**, *56*, 3004–3010, doi:10.1128/AAC.06262-11.
72. Lee, H.; Yang, S. Dimerization of Cell-Penetrating Buforin II Enhances Antimicrobial Properties. *J Anal Sci Technol* **2021**, *12*, doi:10.1186/s40543-021-00264-8.

