

# UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

Sobreexpresión recombinante de mutantes de tripsina III de  
sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*)

TESIS PROFESIONAL PRÁCTICA

Que para obtener el Título de

QUÍMICO EN ALIMENTOS

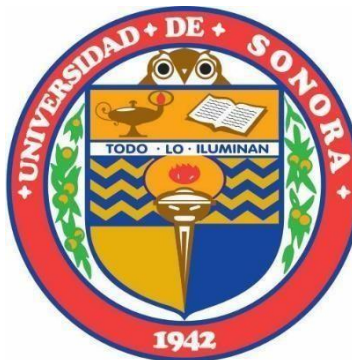
1942  
Presenta:

Nallely Hoyos González

Hermosillo, Sonora

Enero de 2017

# Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

## **APROBACIÓN**

Los miembros del jurado designado para revisar la Tesis Profesional de Nallely Hoyos González la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el Título de Químico en Alimentos.

---

**Dr. Aldo Alejandro Arvizu Flores**  
**Presidente**

---

**Dr. Alonso Alexis López Zavala**  
**Secretario**

---

**cDr. Manuel Ignacio Carretas Valdez**  
**Vocal**

---

**Dr. Víctor Manuel Ocaño Higuera**  
**Suplente**

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Sonora, en especial al departamento de Ciencias Químico Biológicas por contribuir a mi formación académica, haberme dado la oportunidad de cursar mi carrera profesional y hacerme una profesionista de bien.

Al proyecto CONACYT CB2012/180498 “Determinantes moleculares de la adaptación al frío en tripsina de sardina (*Sardinops sagax caerulea*): función de residuos específicos mediante mutagénesis dirigida”, por la beca otorgada durante la realización de esta tesis.

A mi director de tesis Dr. Aldo Alejandro Arvizu Flores un agradecimiento especial por haber confiado y creído en mí, por siempre estar al pendiente de mí tanto en lo profesional como personal, ha sido un gran guía y siempre le estaré agradecida por darme esta oportunidad.

A los integrantes de mi comité Dr. Alonso Alexis López Zavala, cDr. Manuel Ignacio Carretas Valdez y Dr. Víctor Manuel Ocaño Higuera por su guía, conocimientos y apoyo incondicional brindado en esta tesis.

A la Coordinadora del Programa de Químico en Alimentos M.C. María Guadalupe Cádiz Carrasco por todas las atenciones que me brinda.

A los integrantes de Laboratorio de Investigación en Alimentos de la Universidad de Sonora: Dr. Francisco Javier Castillo, Dr. Víctor Manuel Ocaño Higuera, Dra. Abril Graciano, M.C Dalila Canizales, Dr. Eduardo Guevara, en especial al maestro César Otero por su apoyo técnico y además de siempre darle un toque de buen humor al laboratorio y a Dra. Idania Quintero por su apoyo incondicional y consejos tanto en lo profesional como en lo personal.

A todos los profesores que me impartieron clases durante mi carrera, por sus conocimientos y enseñanzas y porque cada uno de ustedes aportaron un granito de arena dentro de mi formación académica.

A mis compañeros de laboratorio: Brisa, Leslie, Isabel, Carolina, Adán, Nathaly y Rafa. En especial a Machuy, Emma y Paola por su amistad, consejos, estar al pendiente de mí, apoyarme en todo y hacer mis días en el laboratorio más pasaderos y divertidos.

A mis amigos: Carolina, Jessica, Alejandra, Antonio, Diana, Danitza, Cesar, Elisa, Mary, Miguel, Braulio y Sebastián por su valiosa amistad, cariño, por siempre darme ánimos para seguir cumpliendo mis metas, por distraerme al salir con ustedes y porque sé que puedo contar con ustedes en las buenas y en las malas. A los amigos que hice durante mi carrera: Marielos, Melissa, Estefania, Mariana, Francisco y Sebastián, por hacer más llevaderas las clases al pasar tiempo juntos estudiando, riendo, comiendo y saliendo a fiestas.

A mi familia en general por su apoyo incondicional en todo lo que me he propuesto, porque sé que ustedes son lo más importante en mi vida y a quienes les dedico todos mis logros.

## DEDICATORIA

*A Dios, por darme vida y salud para poder realizar todas mis metas. De quien siempre voy tomada de la mano y guía mi camino, además de darme fuerza y fé para salir adelante y cumplir todos mis propósitos.*

*A mis padres quienes siempre han estado presente en mi vida apoyándome, guiándome, dándome amor, cariño, consejos, educación, enseñándome el respeto hacia los demás; además por ser mi estímulo para terminar mi carrera profesional. A ustedes un gracias eterno por siempre confiar y creer en mí.*

*A mi hermano que siempre ha estado a mi lado en todo momento, por su apoyo incondicional y cariño, porque para mí es el mejor hermano que Dios me pudo haber dado. Gracias por siempre confiar y creer en mí.*

*A mis abuelos quienes han estado al pendiente de mí, apoyándome, guiándome, dándome consejos, cariño y amor. Gracias por confiar y creer en mí.*

## CONTENIDO

APROBACIÓN.....	3
AGRADECIMIENTOS.....	4
DEDICATORIA.....	6
LISTA DE TABLA.....	9
LISTA DE FIGURAS.....	10
RESUMEN.....	11
INTRODUCCIÓN.....	12
HIPOTESIS.....	14
OBJETIVOS.....	15
Objetivo General.....	15
Objetivos Específicos.....	15
ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.....	16
Sardina Monterey.....	16
Serina Proteasa.....	18
Tripsina.....	18
Enzimas Adaptadas al Frío.....	20
Herramientas de Biología Molecular.....	22
Mutagénesis Dirigida.....	22
Proteínas Recombinantes.....	24
MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
Reactivos.....	28
Preparación de Células Químicamente Competentes.....	28
Transformación en Cepas de <i>Escherichia coli</i> .....	29
Sobreexpresión de Mutantes de Tripsina III.....	30
Lisis Bacteriana.....	30
Análisis de Producción de Proteína Recombinante.....	30

Electroforesis en Gel de Poliacrilamida con Dodecilsulfato de Sodio (SDS-PAGE) .....	30
Actividad Enzimática Frente al Sustrato BA <sub>p</sub> NA.....	31
Cuantificación de Proteína.....	32
RESULTADOS Y DISCUSIONES .....	33
Preparación de Células Químicamente Competentes y Transformación en Cepas de <i>Escherichia coli</i> .....	33
Sobreexpresión de Mutantes de Tripsina III.....	33
Análisis de Producción de Proteína Recombinante.....	34
Mutante de Tripsina III A233N al Inducir la Expresión de Proteína a 25 °C .....	34
Mutante de Tripsina III L234Y al Inducir la Expresión de Proteína a 25 °C .....	38
Comparación de Sobreexpresión de A233N y L234Y al Inducir a Distintas Temperaturas .	41
CONCLUSIONES .....	47
RECOMENDACIONES .....	48
REFERENCIAS .....	49



## LISTA DE TABLA

<b>Tabla</b>		<b>Página</b>
1.	Relación de cepas de <i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) y mutantes de tripsina III	28

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
1.	Sardina Monterey ( <i>Sardinops sagax caerulea</i> )	16
2.	Estructura de tripsina de sardina Monterey	18
3.	Alineamiento parcial de secuencias de aminoácidos de tripsina III y I	19
4.	Diferencias estructurales entre tripsinas mesófilas y adaptadas al frío	20
5.	Estructura química de aminoácidos remplazados en las mutantes de tripsina III	21
6.	Descripción general del método de mutagénesis dirigida QuikChange II	22
7.	Sistema pET para sobreexpresión recombinante en <i>Eschericia coli</i>	24
8.	Mapa del plásmido pET32a	26
9.	SDS-PAGE de mutante de tripsina III A233N	35
10.	Actividad específica de mutante de tripsina III A233N	36
11.	Cuantificación de proteína de mutante de tripsina III A233N	36
12.	SDS-PAGE de mutante de tripsina III L234Y	38
13.	Actividad específica de mutante de tripsina III L234Y	39
14.	Cuantificación de proteína de mutante de tripsina III L234Y	39
15.	SDS-PAGE de mutantes de tripsina III A233N (A) y L234Y (B) al inducir la expresión de proteína a 20 °C	41
16.	SDS-PAGE de mutantes de tripsina III A233N (A) y L234Y (B) al inducir la expresión de proteína a 16 °C	42
17.	Actividad específica de mutantes de tripsina III A233N y L234Y a diferentes temperaturas de inducción	45
18.	Cuantificación de proteína de mutantes de tripsina III A233N y L234Y a diferentes temperaturas de inducción	45

## RESUMEN

Sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*) es el principal producto pesquero en México, donde la mayor parte se destina para la elaboración de productos que generan residuos. Las vísceras son un subproducto aprovechado para la obtención de enzimas proteolíticas como tripsina. La obtención de tripsinas de peces es de importancia científica en el estudio de la relación estructura y función en la adaptación al frío, ya que se ha demostrado que presentan mayor actividad catalítica a temperaturas bajas que su contraparte mesófila. Con la finalidad de comprender la función de ciertos aminoácidos sobre la adaptación al frío, este trabajo tiene como objetivo evaluar distintas condiciones de sobreexpresión para obtener mayor rendimiento de las mutantes de tripsina III de sardina Monterey de forma recombinante en *Escherichia coli*. Este estudio servirá para que futuros trabajos se adentren en la relación entre estructura y función en mutantes de tripsina III. Se utilizaron las cepas de *E. coli* BL21 (DE3) Gold y BL21 (DE3) Origami, las cuales se transformaron con un vector pET-32a que codifica para la tripsina III de sardina Monterey en sus formas mutantes A233N y L234Y, además produce una proteína de fusión a tiorredoxina. La sobreexpresión de proteína se analizó mediante SDS-PAGE, actividad enzimática frente al sustrato BA $\rho$ NA y cuantificación de proteína. Las mutantes de tripsina III se obtuvieron exitosamente de forma recombinante en las cepas utilizadas. Al analizar la producción de proteína se determinó que la cepa de *E. coli* Gold obtuvo un mejor rendimiento de fracción soluble en comparación al fracción insoluble, y mayor actividad enzimática que la cepa Origami. Además, al inducir la expresión de proteína con IPTG a una concentración de 0.5 mM a 16 °C como temperatura de incubación, se obtuvo un mejor rendimiento en comparación a las temperaturas de 25 °C y 20 °C.

## INTRODUCCIÓN

Sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*) es el principal producto pesquero en México, donde la mayor parte se destina para la elaboración de productos que generan residuos. Las vísceras son un subproducto aprovechado para la obtención de enzimas proteolíticas como serina proteasas (Castillo-Yañez y col., 2004). Estas enzimas son utilizadas en la industria alimentaria o en la preparación de hidrolizados de proteínas de pescado (Bougatef y col., 2007). Dentro de las serinas proteasas, la más estudiada es la tripsina, la cual tiene un peso molecular alrededor de 25 kDa. Esta enzima hidroliza los enlaces peptídicos hacia el lado carboxilo de los aminoácidos con carga positiva: lisina y arginina (Di Cera, 2009). Se clasifican principalmente en tres grupos: I, II y III, debido a las diferencias en su secuencia de aminoácidos (Gudmundsdóttir y Pálsdóttir, 2005).

En años recientes se han estudiado enzimas adaptadas al frío las cuales se caracterizan por tener una alta eficiencia catalítica a bajas temperaturas. Leiros y col. (2000) analizaron la estructura de tripsina de distintas especies de peces, en dicho estudio se observó que los puentes de hidrógeno son un factor estabilizador importante en las estructuras de proteínas. La obtención de tripsinas de peces es de importancia científica para conocer la relación estructura y función en la adaptación al frío, ya que se ha demostrado que presentan mayor actividad catalítica a temperaturas bajas que su contraparte mesófila. Por tal motivo, Carretas-Valdez (en preparación) utilizó la herramienta de mutagénesis dirigida en tripsina III de sardina Monterey, en donde obtuvo las mutantes A233N y L234Y, con la finalidad de comprender la función de éstos aminoácidos sobre la adaptación al frío. La mutagénesis dirigida es una herramienta de suma importancia para conocer un poco más acerca de la estructura y función de diferentes proteínas. Se realiza mediante la técnica de PCR donde los oligonucleótidos llevan la mutación puntual donde se reemplazan, eliminan o insertan aminoácidos. Formas recombinantes de enzimas adaptadas al frío han sido expresadas exitosamente en microorganismos como *Escherichia coli*, por lo que se considera factible expresar de igual manera mutantes de tripsina III provenientes de sardina Monterey, sin embargo se ha demostrado que éstas proteínas se expresan en agregados insolubles (Pálsdóttir y Gudmundsdóttir, 2007).

La producción de proteínas recombinantes surgió hace cerca de 30 años, actualmente, cerca del 30 % de las proteínas recombinantes de uso terapéutico son producidas empleando *Escherichia coli* debido a que se conoce extensamente su fisiología y metabolismo, lo cual hace

a esta bacteria ser manipulada genéticamente de manera más sencilla (Lara, 2011). Existen distintos sistemas para producir proteínas recombinantes, el más desarrollado es el sistema pET, el cual es utilizado para la clonación y expresión de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. Los vectores pET se encuentran controlados por el operón *lac* y elementos de la transcripción del bacteriófago T7, contiene un gen que proporciona resistencia a ampicilina, además del gen para la tiorredoxina reductasa (*trxB*) lo cual mejora el plegamiento de la proteína y una etiqueta de poli-histidina para hacer más sencilla su purificación (Novagen, 2006).

La elección de la cepa a utilizar debe ser según la proteína que se desee sobreexpresar, ya que de ella depende gran parte la producción de proteína recombinante. Cepas derivadas de *E. coli* K-12 son las más utilizadas en el ámbito industrial y en particular la cepa de *E. coli* BL21, ya que ha sido diseñada específicamente para la producción de proteína recombinante (Lara, 2011).

En este trabajo se utilizaron dos cepas de *E. coli* para sobreexpresar de manera recombinante a dos formas mutantes de la tripsina III de sardina Monterey. Los resultados muestran que la cepa BL21 Gold produjo mayor concentración de proteína y presentó mayor actividad específica en comparación a la cepa BL21 (DE3) Origami. Al comparar la temperatura de inducción de proteína se observa mayor actividad enzimática y un mejor rendimiento de proteína en extracto soluble en comparación al extracto insoluble a 16 °C. Lo anterior permitió establecer las condiciones adecuadas para la obtención de tripsinas mutantes en forma soluble y activa.

## HIPOTESIS

La sobreexpresión de forma recombinante de las mutantes A233N y L234Y de tripsina III de sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*) en cepas de *Escherichia coli* tendrá un rendimiento satisfactorio de proteína soluble y activa.

## OBJETIVOS

### Objetivo General

Evaluar distintas condiciones de sobreexpresión recombinante de las mutantes A233N y L234Y de tripsina III de sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*).

### Objetivos Específicos

- Obtener cepas de *Escherichia coli* para sobreexpresión recombinante transformadas con las mutantes A233N y L234Y de tripsina III de sardina Monterey.
- Analizar el rendimiento de mutantes A233N y L234Y de tripsina III recombinante soluble en cepas de *Escherichia coli* mediante SDS-PAGE y actividad tipo tripsina mediante ensayo espectrofotométrico.
- Determinar la temperatura adecuada para sobreexpresión recombinante de las mutantes A233N y L234Y de tripsina III en la cepa de *Escherichia coli* con mejor rendimiento de proteína soluble y activa.

## ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

### Sardina Monterey

Sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*) (Figura 1) es un pez pelágico también llamado sardina del Pacífico, ya que su distribución abarca desde el Noroeste de México hasta el Sureste de Alaska. Es el principal producto pesquero en México, ya que tan solo en el Estado de Sonora, en el 2015 se obtuvo una captura de 257,971 toneladas, que representó 221 millones de pesos (SIAP, 2015). La sardina Monterey es procesada para la elaboración de productos como harina y aceite de pescado, producto enlatado o congelado, entre otros. Su procesamiento genera residuos como vísceras, las cuales no son aprovechadas y suelen ser desechadas al mar directamente causando contaminación, el cual suele ser un serio problema ambiental. En trabajos anteriores se ha intentado disminuir la generación de cantidades considerables de residuos y aprovecharlos de una manera sustentable (Castillo-Yañez y col., 2005).

Las vísceras de peces son un potencial subproducto que puede ser aprovechado por su alto contenido de enzimas digestivas. Dentro del sistema digestivo de sardina Monterey se encuentran enzimas proteolíticas, de las cuales más de un tercio son serina proteasas. Estas enzimas son utilizadas en la industria alimentaria o en la preparación de hidrolizados de proteínas de pescado (Bougatef y col., 2007).





Figura 1. Sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*).

## **Serina Proteasa**

Son el grupo de enzimas proteolíticas más abundante y funcionalmente diverso debido a que participan en procesos biológicos claves en el organismo, como la digestión, coagulación e inmunidad. Como ejemplo de la abundancia de estas enzimas, se tiene que de 699 proteasas en el hombre, 178 son serina proteasa, además se encuentran distribuidas en todos los seres vivos que se encuentran en la naturaleza. Este grupo de enzimas son endoproteasas que catalizan la hidrólisis de enlaces en medio de la cadena polipeptídica. Contienen un residuo de serina que actúa como nucleófilo en el sitio activo, atacando al carbonilo y formando un complejo acil-enzima. Dentro de las serina proteasas se encuentran tripsina, quimotripsina y elastasa. Tripsina hidrolizan las cadenas polipeptídicas en residuos cargados positivamente (Arg y Lys), quimotripsina en grupos hidrofóbicos (Phe, Trp y Tyr) y elastasa en residuos de Ala, sin embargo, de todas estas tripsina es la más estudiada (Di Cera, 2009; Isaksen y col. 2014).

## **Tripsina**

La tripsina (Figura 2) es una endoproteasa, con un peso molecular aproximadamente de 25 kDa, que hidroliza los enlaces peptídicos hacia el lado carboxilo de los aminoácidos con carga positiva: lisina y arginina. Es sintetizada y almacenada como tripsinógeno, el cual contiene un péptido señal y un péptido de activación. Para obtener la tripsina activa es necesario eliminar los dos péptidos. La actividad catalítica de estas enzimas se debe a una triada, la cual la componen Asp102, His57 y Ser195 (de acuerdo a la numeración para la tripsina bovina). Las tripsinas de animales marinos y terrestres son similares de acuerdo a su peso molecular (22-30 kDa) y su composición de aminoácidos. Tienen un pH óptimo entre 7-10 y temperatura óptima catalítica entre 35-65 °C (Arvizu-Flores y col., 2012; Rypniewski y col., 1994).

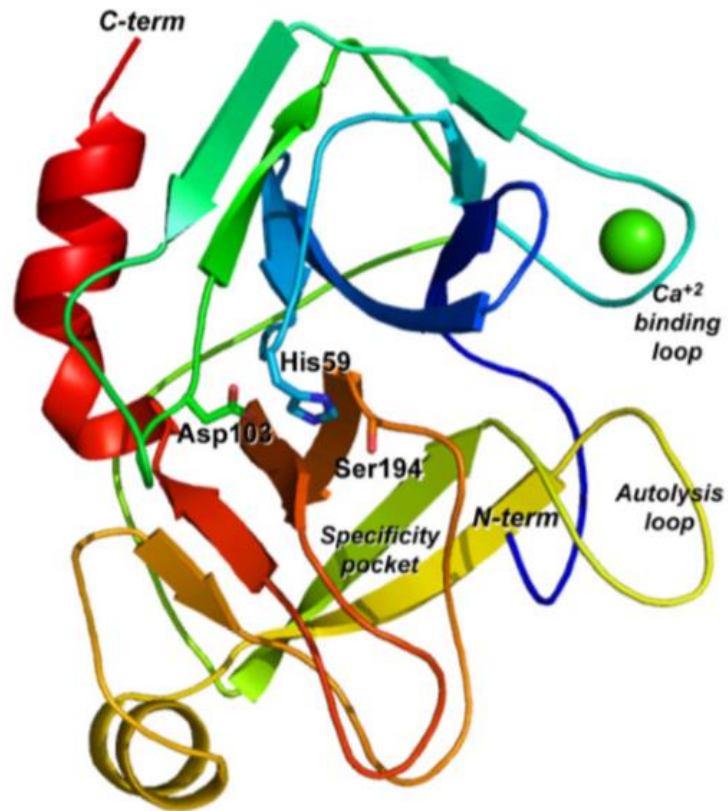


Figura 2. Estructura de tripsina de sardina Monterey. Tomado de Arvizu-Flores y col. (2012).

Las tripsinas son enzimas de suma importancia en la nutrición y desarrollo de los peces. Se clasifican principalmente en tres grupos: I, II y III, debido a las diferencias en su secuencia de aminoácidos (Figura 3). Las tripsinas del grupo III se incluyen en especies de peces adaptados al frío, la cual es activa a 2 °C e inactivada a 30 °C. Por el contrario, tripsinas del grupo I muestran su actividad enzimática entre 4-55 °C y son inactivadas a 65 °C. Además, se ha comprobado que tripsinas adaptadas al frío del grupo III son muy inestables, debido a que suelen formar menor cantidad de puentes de hidrógeno y por otro lado, tienden a formar agregados insolubles (Gudmundsdóttir y Pálsdóttir, 2005).

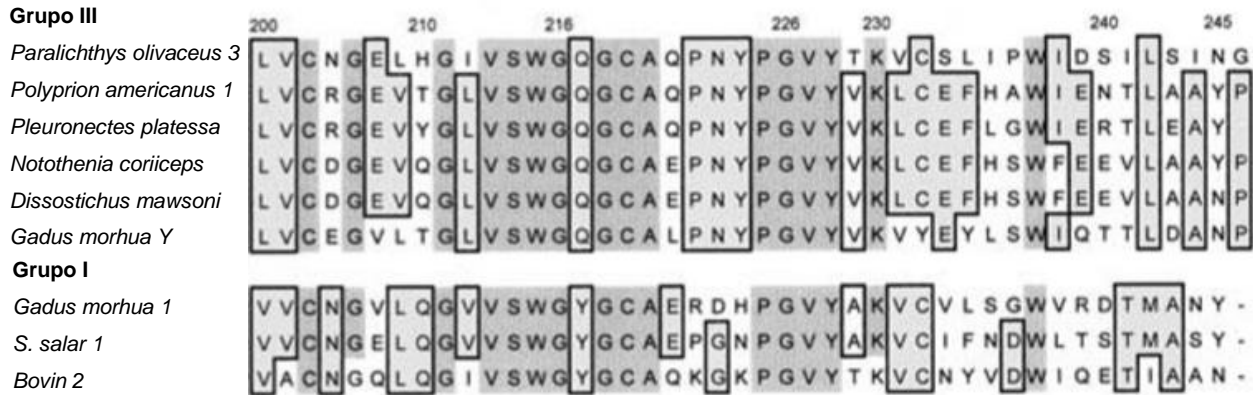


Figura 3. Alineamiento parcial de secuencias de aminoácidos de tripsina III y I (200-245). Áreas en gris oscuro muestran residuos que son idénticos en todas las tripsinas y áreas en gris claro indican residuos que son idénticos dentro de cada uno de los 2 grupos de tripsinas. Tomado de Gudmundsdóttir y Pálisdóttir (2005).

### Enzimas Adaptadas al Frío

En años recientes se han estudiado enzimas adaptadas al frío las cuales se caracterizan por tener una alta eficiencia catalítica a bajas temperaturas. Dentro de las enzimas adaptadas al frío reportadas hasta ahora son tripsina, elastasa, pepsina,  $\alpha$ -amilasa, citrato sintasa, maleato deshidrogenasa y triosafosfato isomerasa (Leiros y col., 2000). Tripsinas recombinantes del grupo I y III se han caracterizado y han demostrado ser muy diferentes en su secuencia de aminoácidos, pH óptimo y en el rango de temperatura de su actividad enzimática. En la actualidad existen pocas publicaciones acerca de las enzimas proteolíticas adaptadas al frío, lo cual podría deberse a que en dichos estudios se han presentado dificultades relacionadas con la sensibilidad a la inactivación por calor, bajo pH, a la degradación autolítica y la formación de agregados insolubles (Gudmundsdóttir y Pálisdóttir, 2005).

Leiros y col. (2000) analizaron la estructura de tripsina de distintas especies, comparando las diferencias conformacionales, interacciones de puentes de hidrógeno, puente salino, interacciones aromáticas y densidad de empaquetamiento de los núcleos. Con base a esto, se observó que los puentes de hidrógeno son un factor estabilizador importante en la estructuras de proteínas. Entre las tripsinas adaptadas al frío y mesófilas, no hubo diferencia en el número de puentes de hidrógeno; sin embargo, si hubo diferencia en ciertas regiones de la estructura. Existen tres regiones (residuos 16-29, 109-133 y 231-245) que son de suma

importancia, ya que es donde se encuentra conectada la estructura de dos dominios de tripsina. Además de determinar la capacidad de movimiento entre dominios, esta región es importante para la estabilidad. Por otro lado, la capacidad de movimiento influye en la capacidad catalítica, debido a que el sitio catalítico se encuentra entre los dos dominios antes mencionados (Leiros y col., 2000).

Las tripsinas mesófilas cuentan con cinco puentes de hidrógeno entre dominios, en contraste, ninguno de estos enlaces están presentes en las tripsinas adaptadas al frío (Figura 4). Esto se debe a la diferencia en su secuencia de aminoácidos: Asn179 por Ala o Ser, Thr229 por Ala, Asn233 por Ile/Leu/Val y Tyr234 por Phe/Leu. Con base a esto, las tripsinas mesófilas presentan aminoácidos más polares que las tripsinas adaptadas al frío, por lo tanto, estas últimas muestran mayor hidrofobicidad, debido a que tienen menos interacciones de Van der Waals y por consiguiente son menos estables (Leiros y col., 2000).

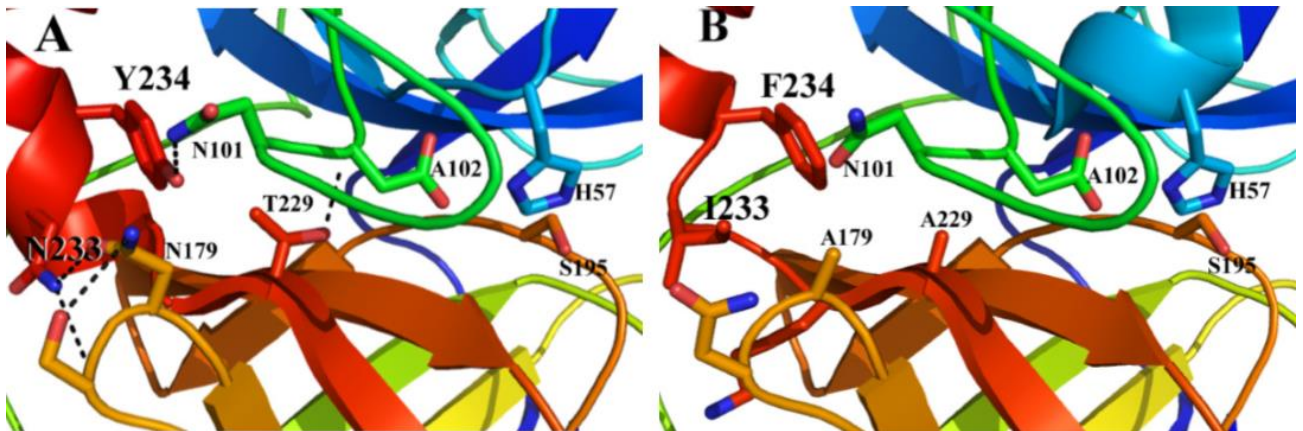


Figura 4. Diferencias estructurales entre tripsinas mesófilas y adaptadas al frío. Se muestra la red de puentes de hidrógeno entre la hélice- $\alpha$  en el carboxilo terminal y los dominios de A) la tripsina mesófila (PDB: 3PTB) que no se encuentran en B) las tripsinas adaptadas al frío (PDB: 2TBS).

## Herramientas de Biología Molecular

### Mutagénesis Dirigida

Estudios enfocados a obtener mutantes de las tripsinas de bovino o de rata con actividad a baja temperatura lograron incrementar la actividad catalítica hasta 1.5 veces en frío (Mikhailova y col., 2003). Sin embargo, estas mutantes fueron realizadas hacia el lazo de autólisis de la enzima mesófila, lo que conlleva a que la actividad proteolítica se mantenga mayor tiempo. Con el objetivo de analizar la relación entre estructura y función en tripsina al remplazar aminoácidos hidrofóbicos por polares en una de las regiones entre dominios (Figura 5), Carretas-Valdez (en preparación) realizó mutagénesis dirigida en tripsina III de sardina Monterey, en donde se obtuvieron dos mutantes:

1. A233N: se remplazó en el aminoácido número 233 (según la secuencia de aminoácidos de tripsina III de sardina Monterey) una alanina (A) por asparagina (N).
2. L234Y: se remplazó en el aminoácido número 234 (según la secuencia de aminoácidos de tripsina III de sardina Monterey) una leucina (L) por tirosina (Y).

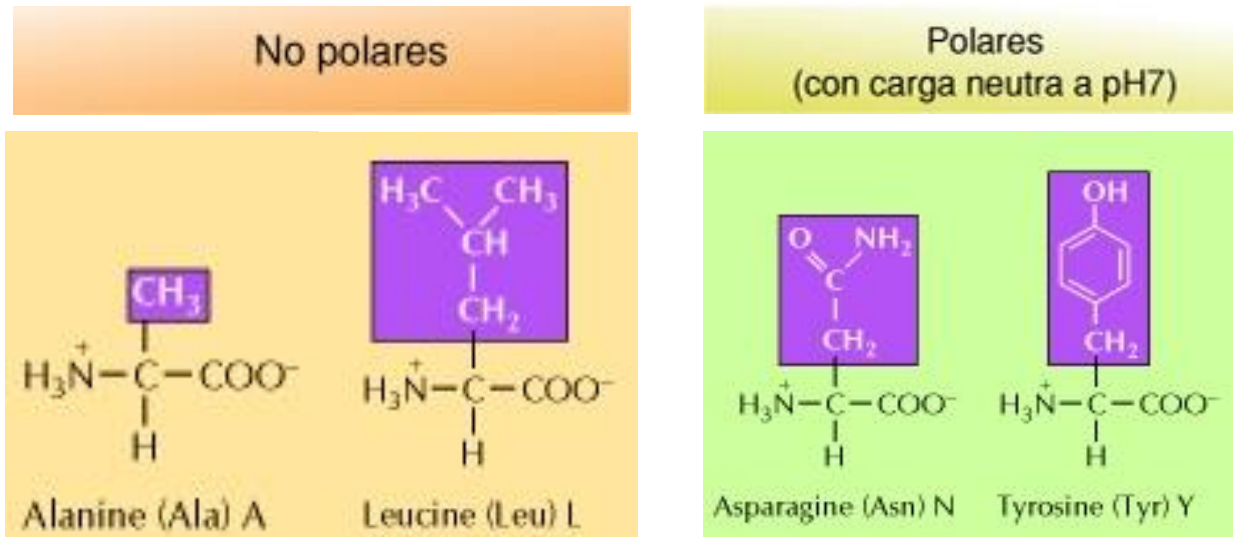


Figura 5. Estructura química de aminoácidos remplazados en las mutantes de tripsina III. Se muestra la estructura química de aminoácidos no polares (los cuales fueron reemplazados) y polares que intervienen en la mutación realizada.

La mutagénesis dirigida es una herramienta de biología molecular de suma utilidad para conocer la importancia de un aminoácido específico en la estructura y función de diferentes proteínas (Figura 6). Se realiza mediante la técnica de PCR, donde los oligonucleótidos llevan la mutación puntual, que al ser extendido por una ADN polimerasa, se reemplazan, eliminan o insertan aminoácidos. El método de QuikChange-II para realizar mutagénesis dirigida presenta una eficacia de mutación superior al 80%, además utiliza un protocolo sencillo el cual se realiza en un día (Hogrefe y col., 2002).

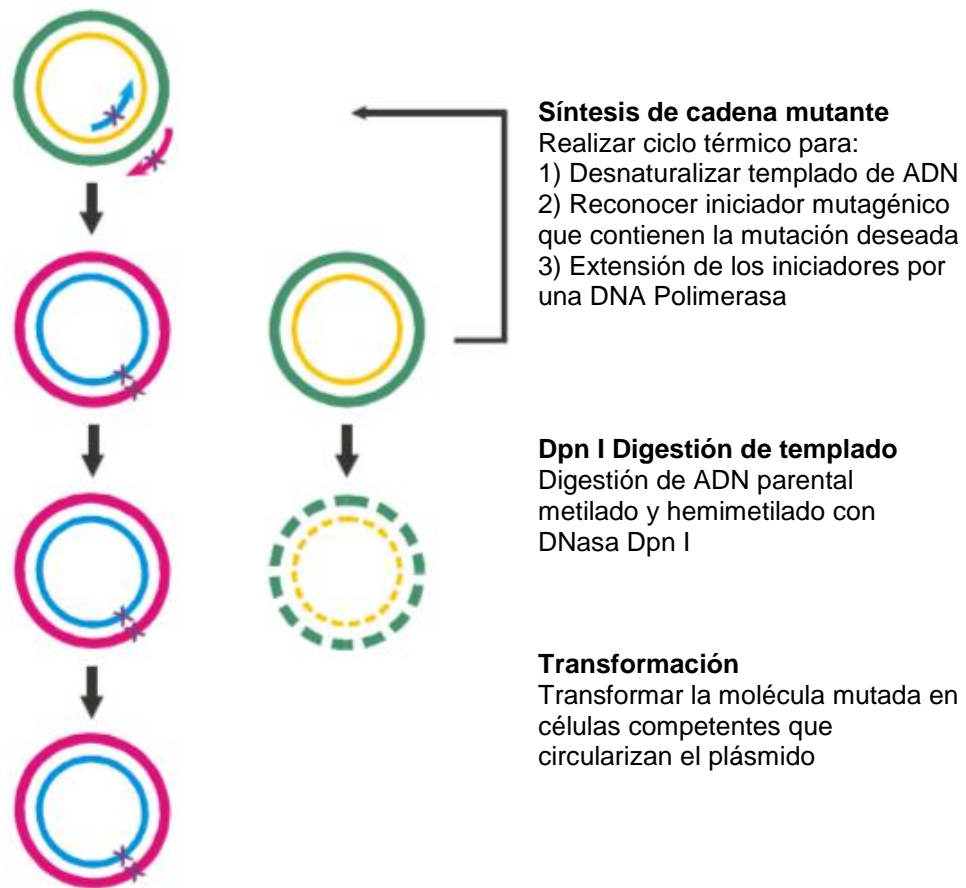


Figura 6. Descripción general del método de mutagénesis dirigida QuikChange II. Tomado de Agilent Technologies (2015).

En algunas publicaciones, formas recombinantes de enzimas adaptadas al frío han sido expresadas exitosamente en microorganismos como *Escherichia coli* (Pálsdóttir y Gudmundsdóttir, 2007), por lo que se considera factible expresar de igual manera mutantes de tripsina III y con esto seguir con sus estudios acerca de su estructura y función. Sin embargo, es importante evaluar las condiciones óptimas de sobreexpresión recombinante de dichas mutantes.

### **Proteínas Recombinantes**

La producción de proteínas recombinantes surgió hace cerca de 30 años debido a necesidades de uso terapéutico. Actualmente, cerca del 30 % de las proteínas recombinantes de uso terapéutico son producidas empleando *Escherichia coli* debido a que se ha estudiado extensamente su fisiología y metabolismo, por lo cual se hace más sencillo manipular genéticamente a dicho microorganismo (Lara, 2011).

Existen distintos sistemas para producir proteínas recombinantes, el más desarrollado es el sistema pET (Figura 7), el cual es utilizado para la clonación y expresión de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. La información genética de la proteína a producir es clonada en los plásmidos pET, los cuales se encuentran controlados por el operón *lac* y elementos de la transcripción del bacteriófago T7. Al insertar el gen heterólogo en la bacteria, la transcripción de éste es controlado por el promotor T7, el cual está regulado por el operador *lac*. Debido a que la T7 RNA polimerasa también se encuentra regulada por el represor *lac*, la inducción del sistema requiere de la adición del inductor isopropil- $\beta$ -D-tiogalactósido (IPTG) para permitir la transcripción del gen de interés (Studier y Moffatt, 1986).



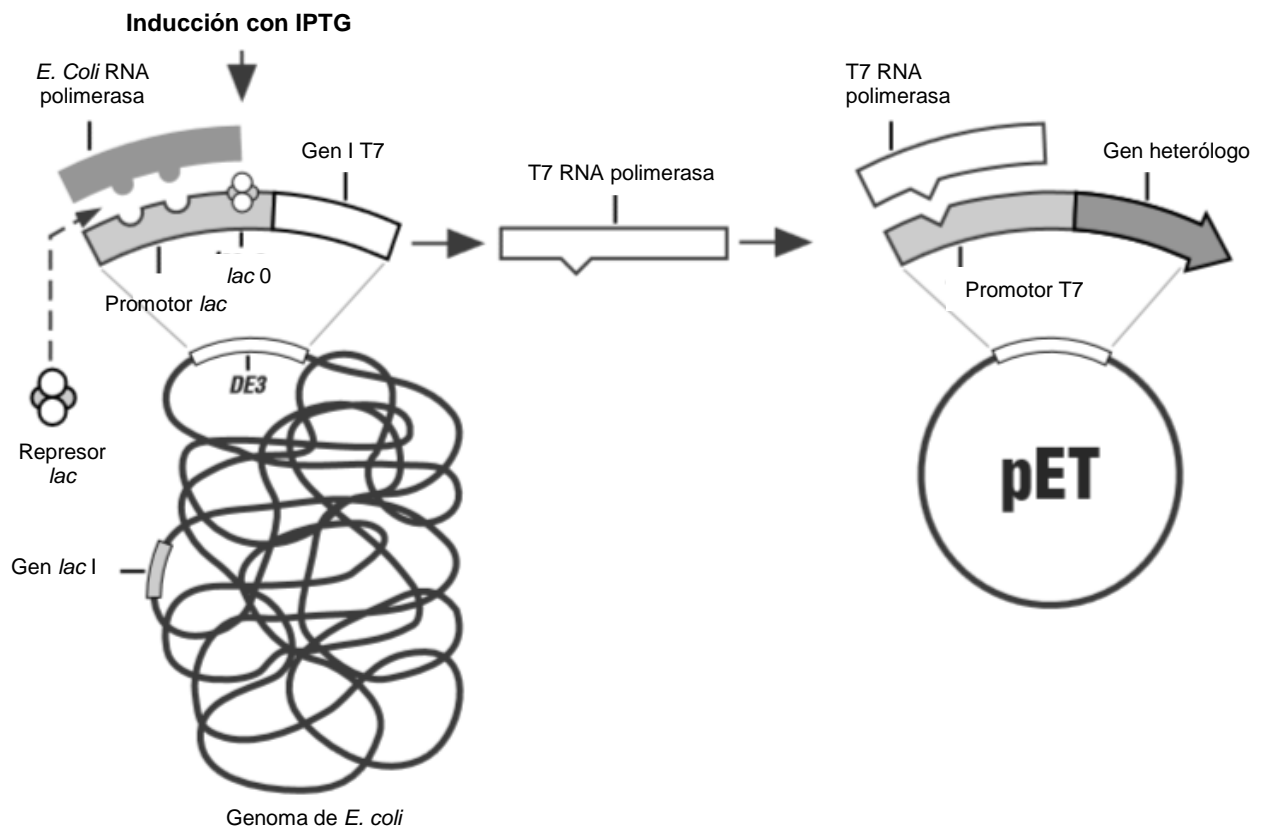


Figura 7. Sistema pET para sobreexpresión recombinante en *Escherichia coli*. Tomado de Novagen (2006).

Por lo general, el plásmido de expresión (Figura 8) contiene un gen que proporciona resistencia a antibiótico para asegurar la selección de cultivar únicamente las bacterias que contienen el plásmido de interés, el más utilizado es la ampicilina. Además contiene un gen que codifica para el epítipo S-tag, el cual es de utilidad para la detección de la proteína de interés mediante una prueba de ELISA. Por otro lado, la adición de tiorredoxina reductasa (trxB) permite la formación de enlaces disulfuro en citoplasma, que usualmente son reducidos en *E. coli*, lo cual mejora el plegamiento de la proteína recombinante. Asimismo la adición de una etiqueta de poli-histidina se agrega para volver más sencilla la manera de purificar la proteína mediante cromatografía de afinidad de metales (Carretas-Valdez, 2014; Pálsdóttir y Gudmundsdóttir, 2007).

Es de suma importancia la elección de la cepa, ya que de ella depende gran parte la producción de proteína recombinante. La bacteria *E. coli* es la más común a utilizar, ya que su genoma es ampliamente conocido así como su fisiología y metabolismo, además, crece rápidamente en diversos medios de cultivo. Cepas derivadas de *E. coli* K-12 son las más utilizadas en el ámbito industrial. En particular, la cepa BL21 ha sido diseñada específicamente para la producción de proteína recombinante ya que carece de dos proteasas, las cuales pueden causar la degradación de la proteína recombinante que se desee producir (Guevara-Hernández y col., 2013; Lara, 2011).

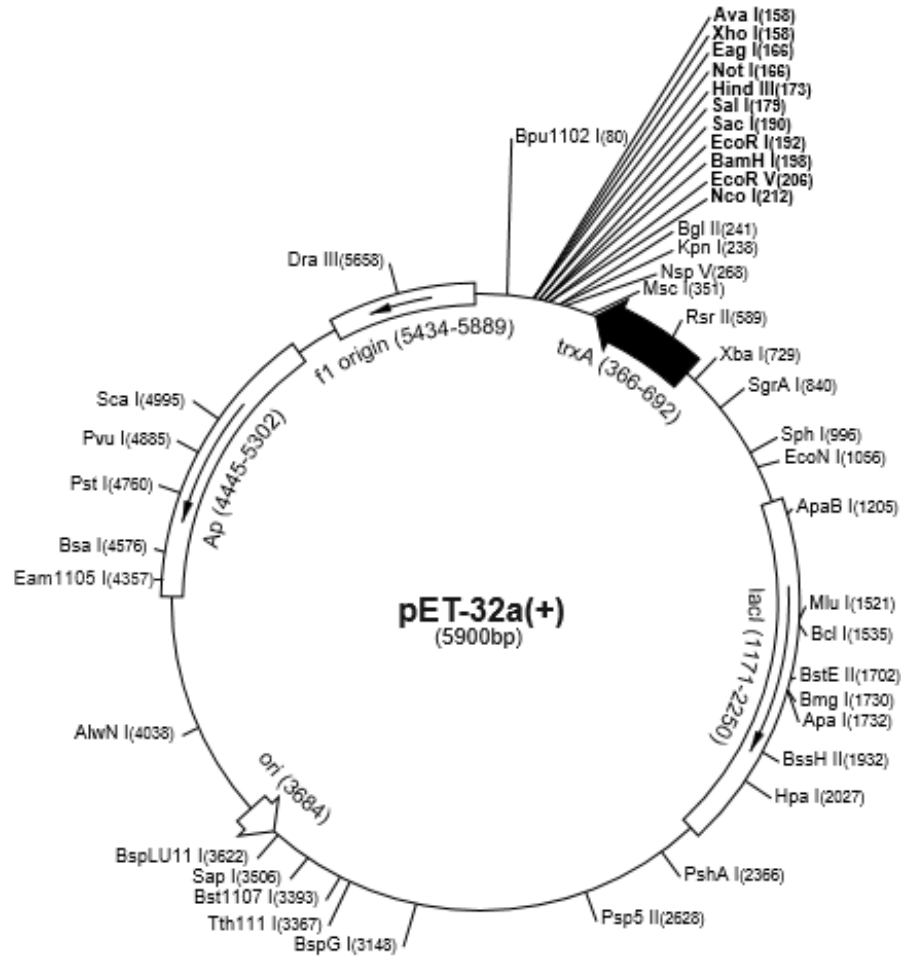


Figura 8. Mapa del plásmido pET-32a. Tomado de EMD Millipore.

La obtención de proteínas recombinantes es de importancia científica para conocer la relación estructura y función, además de buscar las condiciones óptimas para obtener la forma nativa. Este trabajo tiene como fin encontrar las condiciones óptimas para obtener las tripsinas mutantes de forma recombinante, para en futuros trabajos analizar la relación entre estructura y función en mutantes de tripsina III a las cuales se le han remplazado aminoácidos hidrofóbicos por polares en una de las regiones entre dominios. Con base a esto, se generaría información básica para que posteriormente se realicen estudios acerca de sus características bioquímicas y cinéticas que podrían contribuir a la aplicación comercial de este subproducto.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizaron ensayos preliminares en los cuales se analizaron factores biológicos (distintas cepas de *E. coli*), físicos (temperatura de inducción, velocidad de agitación y tiempo de incubación) y químicos (concentración de IPTG). En base a los resultados de estos preliminares se decidió variar las cepas de *E. coli* y temperatura de inducción de proteína. Los resultados mostrados de actividad específica y concentración de proteína son el promedio y desviación estándar de tres lecturas, las cuales se calcularon mediante el software Graphpad.

### Reactivos

Se utilizaron las cepas de *Escherichia coli* BL21 (DE3): Gold y Origami, disponibles comercialmente y almacenadas en glicerol a -80 °C. Los plásmidos que contienen la tripsina III de sardina Monterey en sus formas mutantes A233N y L234Y se obtuvieron previamente por Carretas-Valdez (en preparación) con apoyo del Dr. Sergio Casas del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT). Los plásmidos que codifican para las tripsinas mutantes fueron amplificados a partir del plásmido pET32a-TryIII, mismo que fue optimizado para su expresión en *E. coli* y proporcionado por GeneArt. Los medios de cultivo y otros reactivos utilizados fueron de grado biología molecular.

### Preparación de Células Químicamente Competentes

Para la preparación de células químicamente competentes se tomó una asada de cada cepa de *E. coli* almacenada en glicerol y se inoculó en 5 mL de medio Luria Broth (LB) suplementado con ampicilina a 100 µg/mL como agente de selección, después se incubó a 37 °C, 225 rpm durante 16-18 h. Se agregó 250 µL de éste pre-inóculo a matraces con 25 mL de medio LB con ampicilina y se incubó a las condiciones antes mencionadas hasta llegar a una absorbancia de 0.3 a 600 nm. A continuación, se transfirió a tubos estériles de 50 mL y se centrifugó a 4 °C, 3,486 x g durante 15 min, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet bacteriano en 7.7 mL de solución CaCl<sub>2</sub> 0.1 M en glicerol al 15% frío y estéril después se centrifugó a las mismas condiciones antes mencionadas. Posteriormente, se descartó el sobrenadante y se resuspendió en 1.27 mL de CaCl<sub>2</sub> y glicerol. Por último, se realizaron alícuotas de 40 µL en microtubos estériles y previamente enfriados a 4 °C. Se utilizaron alícuotas al momento para su transformación y el resto se almacenaron a -80 °C (Green MR y Sambrook J, 2012).

### Transformación en Cepas de *Escherichia coli*

Se transformaron las cepas de *Escherichia coli* BL21 (DE3) agregándoles los plásmidos que contiene la tripsina III de sardina Monterey en sus formas mutantes A233N o L234Y. Se descongelaron en hielo las cepas de *E. coli* químicamente competentes, a continuación se agregó 2  $\mu$ L de plásmido y se resuspendió; después se incubó durante 30 min en hielo. Consecuentemente, se aplicó choque térmico en baño de agua a 42 °C durante 42 s, regresando a incubar en hielo durante 2 min más. El choque térmico desestabiliza la membrana celular, de manera que favorece la entrada del ADN a la célula a través de poros temporales formados en la membrana. Después se agregó 250  $\mu$ L de medio SOC y se incubó a 37 °C, 225 rpm durante 1 h. Posteriormente se sembró en placa de agar LB con ampicilina y se incubó a 37 °C. Por último, se inoculó una colonia típica de *E. coli* en tubos con 5 mL de medio LB con ampicilina y se incubó a 37 °C, 225 rpm durante 8h y se realizó stocks de glicerol agregando 700  $\mu$ L de medio y 300  $\mu$ L de glicerol al 50% estéril en microtubos estériles (Green MR y Sambrook J, 2012). Se obtuvieron 4 cepas de *Escherichia coli* BL21 (DE3) (Tabla 1).

Tabla 1. Relación de cepas de *Escherichia coli* BL21 (DE3) y mutantes de tripsina III. Se utilizaron las cepas Gold y Origami transformadas con los plásmidos pET32a que codifican para las mutantes de tripsina III de sardina Monterey.

Cepa Mutante	<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) Gold	<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) Origami
<b>A233N</b>	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) Gold con vector pET-32a que contiene mutante A233N de tripsina III de sardina Monterey	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) Origami con vector pET-32a que contiene mutante A233N de tripsina III de sardina Monterey
<b>L234Y</b>	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) Gold con vector pET-32a que contiene mutante L234Y de tripsina III de sardina Monterey	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) Origami con vector pET-32a que contiene mutante L234Y de tripsina III de sardina Monterey

### **Sobreexpresión de Mutantes de Tripsina III**

Al obtener las cepas de *Escherichia coli* transformadas con los plásmidos de las mutantes de tripsina se continuó con la sobreexpresión para la cual se tomó con una asa bacteriológica un poco de la cepa, respectivamente, y se inoculó en 5 mL de medio LB con ampicilina; después se incubó a 37 °C, 225 rpm durante 13-15 h. A continuación, se inoculó 250 µL del pre-inóculo anterior en 50 mL de medio LB con ampicilina y se incubó a las mismas condiciones del pre-inóculo hasta llegar a una absorbancia de 0.6 a 600 nm. Después se indujo la expresión de proteína mediante la adición de IPTG 0.5 mM y se evaluaron las condiciones óptimas de sobreexpresión en cultivos independientes a distintas temperaturas: 16 °C, 20 °C y 25 °C a 225 rpm. Posteriormente se tomaron muestras de 1.5 mL a las cuales se les midió su absorbancia antes de inducir y a las 1, 3, 6 y 18 h después de inducir. Por último las muestras se centrifugaron a 1,957 × g durante 5 min, se descartó el sobrenadante y se guardó el pellet bacteriano a -20 °C (solo la muestra antes de inducir se dejó incubando 18 h antes de centrifugar) (Novagen, 2006).

### **Lisis Bacteriana**

Para lisar las células bacterianas, se resuspendió cada uno de los pellets bacterianos almacenados a -20 °C en 300 µL de buffer lisis (Tris HCl 20 mM, EDTA 2.5 mM e imidazol 5 mM). Después se sonicaron las muestras aplicando 5 pulsos de 10 s a 15 % amplitud (manteniendo las muestras en hielo). Posteriormente se centrifugó a 13,226 x g durante 5 min, por último se separó la fracción soluble e insoluble.

### **Análisis de Producción de Proteína Recombinante**

La sobreexpresión de la proteína recombinante se analizó por SDS-PAGE, por la actividad enzimática frente al sustrato BA<sub>p</sub>NA (benzoiL-L-Arg-p-nitroanilida) y por la cuantificación de proteína mediante el método colorimétrico de Bradford.

### **Electroforesis en Gel de Poliacrilamida con Dodecilsulfato de Sodio (SDS-PAGE)**

La presencia y tamaño de las proteínas recombinantes fueron monitoreadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones reductoras y desnaturizantes (Laemmli,1970), usando un gel de empaquetamiento al 4 % y un gel de separación al 12 %.

Para analizar las muestras de fracción del extracto soluble se tomaron 30  $\mu\text{L}$  de cada muestra y se mezclaron con 15  $\mu\text{L}$  de buffer muestra (Tris-HCl 125 mM pH 6.8, SDS 4 %, glicerol 20 %,  $\beta$ -mercaptoetanol 10 % y azul de bromofenol 0.0004 %), las muestras de fracción insoluble se diluyeron en 50  $\mu\text{L}$  de agua ultrapura y se mezclaron con 25  $\mu\text{L}$  de buffer muestra. Después fueron calentadas a 95  $^{\circ}\text{C}$  durante 8 min, se enfriaron y se cargaron 15  $\mu\text{L}$  de cada muestra, para la separación de proteína se utilizó 140 V constantes. Los geles fueron teñidos con solución de azul de Coomassie brillante 0.25 % en metanol 40 % y ácido acético 10 %. Se utilizó un marcador de peso molecular de amplio rango (Brio Rad).

### **Actividad Enzimática Frente al Sustrato BApNA**

La actividad enzimática de las mutantes de tripsina fue determinada usando como sustrato BApNA, de acuerdo al método reportado por Erlanger y col. (1961), con algunos ajustes en cuanto a volumen de reacción. El ensayo consiste en medir el cambio de absorbancia, ya que las mutantes de tripsina al presentar actividad, catalizan la hidrólisis del enlace de arginina para producir *p*-nitroanilida, la cual presenta un color amarillo, ésta tiene un máximo de absorbancia a una longitud de onda de 410 nm, Experimentalmente se mezcló 50  $\mu\text{L}$  de la fracción soluble del extracto con 200  $\mu\text{L}$  de buffer actividad (Tris-HCl 100 mM pH 7.5,  $\text{CaCl}_2$  10 mM y BApNA 1 mM) en microplaca. Posteriormente, la producción de *p*-nitroanilida se midió a un tiempo final de 14 h mediante la absorbancia de la reacción a 415 nm de longitud de onda, utilizando un espectrofotómetro de microplaca xMark-Bio Rad. Se usó como blanco una reacción con buffer lisis en lugar de muestra. La actividad específica de las mutantes de tripsina III se calculó mediante la pendiente de la recta al graficar absorbancia a 415 nm contra tiempo de reacción (min):  $\Delta\text{Abs}/\text{min}$ , por último se usó la siguiente fórmula para la determinación de unidades/mL( $\mu\text{mol}/\text{mL min}$ ):

Siguiendo la ley de Lambert-Beer:

$$A = \epsilon bc,$$

por lo tanto,  $c = A / \epsilon b$

$$U/\text{mL} = A / (8800 \text{ M}^{-1}\text{Lcm}^{-1}) (0.85 \text{ cm}) (1000)$$

Donde:

$c$  = Unidades de actividad por mL de muestra.

$A$  = Cambio de absorbancia por min.

$(8800 \text{ M}^{-1}\text{Lcm}^{-1})$  = Coeficiente de extinción molar del sustrato BA<sub>p</sub>NA.

$(0.85 \text{ cm})$  = Tamaño del pocillo de microplaca.

$(1000)$  = Factor de conversión de unidades.

Posteriormente, se determinó las unidades del volumen final de la reacción (0.25 mL). Por último, se determinó las unidades en el volumen de muestra añadidos a la reacción (50  $\mu\text{L}$ ), y con esto se calculó la actividad específica de la reacción en U/mg (Carretas-Valdez, 2014).

### **Cuantificación de Proteína**

La concentración de proteína se cuantificó mediante el método colorimétrico de Bradford, el cual se basa en formar un complejo de color azul entre colorante Azul de Coomassie G-250 y proteína. Se mezclaron 5  $\mu\text{L}$  de fracción soluble del extracto con 250  $\mu\text{L}$  de reactivo de Bradford en microplaca, después se midió absorbancia a una longitud de onda de 570 nm utilizando un espectrofotómetro de microplaca xMark-Bio Rad. Por último, la absorbancia de la solución se comparó con una curva estándar de seroalbúmina bovina (Bradford, 1976). Las concentraciones se calcularon con la ecuación de la recta:

$$x = (y - 0.0151) / 0.0004, R^2 > 95 \%$$

Donde:

$x$  = absorbancia de la solución a 570 nm.

$y$  = concentración de proteína ( $\mu\text{g/mL}$ ).



## RESULTADOS Y DISCUSIONES

### Preparación de Células Químicamente Competentes y Transformación en Cepas de *Escherichia coli*

Se obtuvieron cepas de *Escherichia coli*: BL21 Gold y Origami químicamente competentes, consecuentemente, se transformaron las cepas con un vector pET-32a que contiene un gen que codifica para tripsina III de sardina Monterey en sus formas mutantes A233N o L234Y. La transformación fue exitosa, ya que al inocularlos en agar LB suplementado con ampicilina se observó el crecimiento de colonias convexas, lisas, redondas y color blanco características de *E. coli*. El agar suplementado con ampicilina es un agar selectivo para bacterias que tengan resistencia a éste antibiótico, por lo tanto con esto se confirma la transformación de las cepas de *E. coli* con el vector pET-32a. El crecimiento bacteriano en presencia del antibiótico indica que las bacterias poseen el respectivo plásmido, existen vectores que codifican a otros antibióticos por ejemplo: el vector pET-28a, contiene un gen que confiere la resistencia al antibiótico kanamicina (Castro y col., 2006).

### Sobreexpresión de Mutantes de Tripsina III

Al sobreexpresar las cepas de *E. coli* transformadas con los plásmidos de las mutantes de tripsina III a 37 °C se observó un incremento de absorbancia a una longitud de onda de 600 nm proporcional al crecimiento celular. Aproximadamente después de 3 h de inocular en el matraz con 50 mL de medio LB suplementado con ampicilina se llegó a la absorbancia de 0.6. Posteriormente se indujo la expresión de proteína y por último se analizó la producción de proteína recombinante. En dicho análisis se observó que ambas cepas *E. coli* BL21 (DE3) producen a tripsina III en sus formas mutantes en extracto insoluble tanto como soluble, sin embargo, *E. coli* BL21 (DE3) Gold produjo mayor concentración de proteína y actividad enzimática en comparación a la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) Origami. Por lo tanto, se eligió dicha cepa para evaluar las condiciones óptimas de sobreexpresión a distintas temperaturas de inducción. *E. coli* es la célula más utilizada para producir proteínas recombinantes, debido a que presenta un crecimiento celular en corto tiempo, lo que permite una inducción en menor tiempo (12 h a 25 °C) comparado con *P. pastoris* (3-5 días a 20 °C) (Pálsdóttir y Gudmundsdóttir, 2007).

Después de haber elegido la cepa *E. coli* BL21 (DE3) Gold se sobreexpresaron ambas mutantes de tripsina III a las mismas condiciones antes mencionadas. Al llegar a la absorbancia de 0.6 a 600 nm se indujo la expresión de proteína mediante la adición de IPTG a una concentración final de 0.5 mM y se evaluó la sobreexpresión en cultivos independientes a distintas temperaturas: 25 °C, 20 °C y 16 °C a 225 rpm. Por último, de igual manera como se mencionó anteriormente, se tomaron muestras a distintos tiempos para analizar la producción de proteína recombinante.

### **Análisis de Producción de Proteína Recombinante**

#### **Mutante de Tripsina III A233N al Inducir la Expresión de Proteína a 25 °C**

Al inducir la expresión de proteína a 25 °C se observa la banda de mutante de tripsina III A233N en SDS-PAGE (Figura 9) en un peso molecular alrededor de 45 kDa. Cabe destacar que la tripsina tiene un peso molecular alrededor de 25 kDa, sin embargo, las mutantes de tripsina III son proteínas de fusión que contiene una proteína de tiorredoxina y una etiqueta de poli-histidina (HP), las cuales agregan entre 13-27 kDa aumentando su peso molecular a aproximadamente 45 kDa (Pálsdóttir y Gudmundsdóttir, 2007). Carretas-Valdez (2014) al sobreexpresar tripsina III de sardina Monterey, el peso molecular de la proteína de fusión (tipsinógeno-tiorredoxina-HP) al igual que las mutantes fue alrededor de 45 kDa. Sin embargo, Pálsdóttir y Gudmundsdóttir (2007) al sobreexpresar tripsina III del bacalao del Atlántico el peso molecular de la proteína de fusión (tipsinógeno-tiorredoxina-HP) fue de 40 kDa.

La mayor producción de proteína se observa en la fracción insoluble, sin embargo, también aparece proteína en la fracción soluble. Conforme aumenta el tiempo de inducción las bandas que corresponden a la mutante A233N se observan cada vez con mayor intensidad. Esto se debe a que el incremento de la producción de proteína soluble e insoluble es proporcional al crecimiento celular.

En la Figura 10 se observa un incremento de actividad específica de  $2.73 \times 10^{-5}$  U/mg a  $1.09 \times 10^{-4}$  U/mg entre 1 a 3 h después de inducir la expresión de proteína. La actividad específica al terminar la sobreexpresión después de 18 h de inducción fue de  $1.26 \times 10^{-4}$  U/mg. Al comenzar la inducción de proteína, el crecimiento de las bacterias es de forma exponencial,

por lo tanto, la producción de proteína incrementa. Al tener mayor cantidad de proteína, hay mayor actividad enzimática. A partir de 3 h después de inducir no se observa un incremento considerable de la actividad específica, esto podría deberse a que la mutante de tripsina III se autoactiva (Carretas-Valdez, 2014). Por lo tanto, al haber mayor cantidad de mutante de tripsina III activa podría sufrir degradación autolítica, lo que repercute en la disminución de actividad específica.

En la Figura 11 se observa un incremento de concentración de proteína de 0.83 mg/mL a 1.91 mg/mL entre 6 a 18 h después de inducir la expresión de proteína. Esto es debido a que al comenzar la inducción de proteína, el crecimiento de las bacterias es de forma exponencial, por lo tanto, de igual manera la producción de proteína incrementa. En un estudio realizado acerca de la tripsina I del bacalao del Atlántico se encontró una temperatura óptima para inducción de la expresión de proteína de 25 °C y un tiempo óptimo de inducción de 10 h (Jónsdóttir y col., 2004).

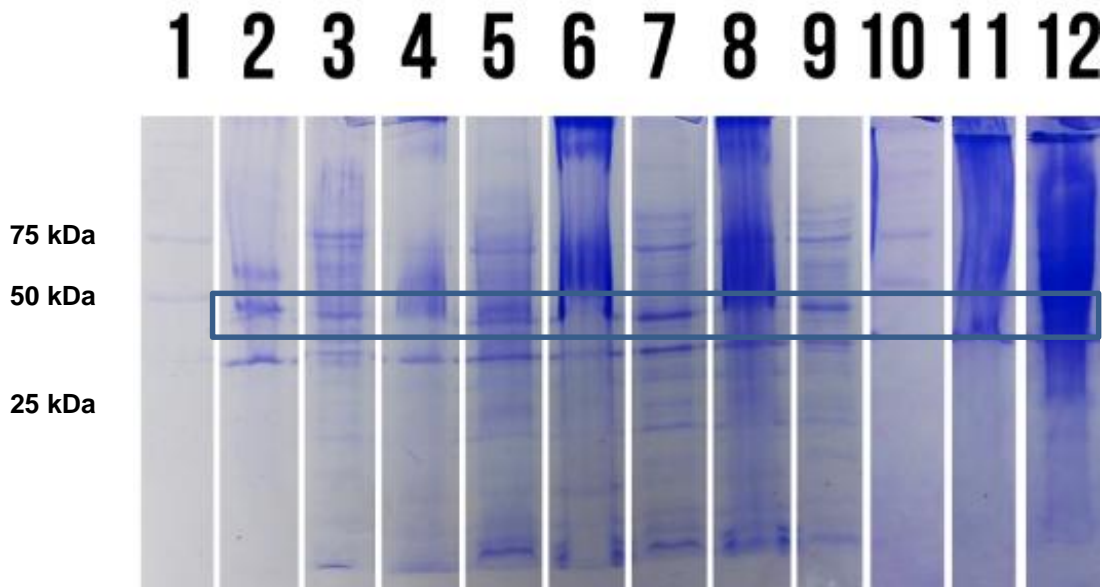


Figura 9. SDS-PAGE de mutante de tripsina III A233N. La inducción de la expresión de proteína fue a 25 °C.

Carril:

- #1: marcador
- #2: Fracción insoluble antes de inducir
- #3: Fracción soluble antes de inducir
- #4: Fracción insoluble 1h después de inducir
- #5: Fracción soluble 1h después de inducir
- #6: Fracción insoluble 3h después de inducir

Carril:

- #7: Fracción soluble 3h después de inducir
- #8: Fracción insoluble 6h después de inducir
- #9: Fracción soluble 6h después de inducir
- #10: Fracción insoluble 18h después de inducir
- #11: Marcador
- #12: Fracción soluble 18h después de inducir.

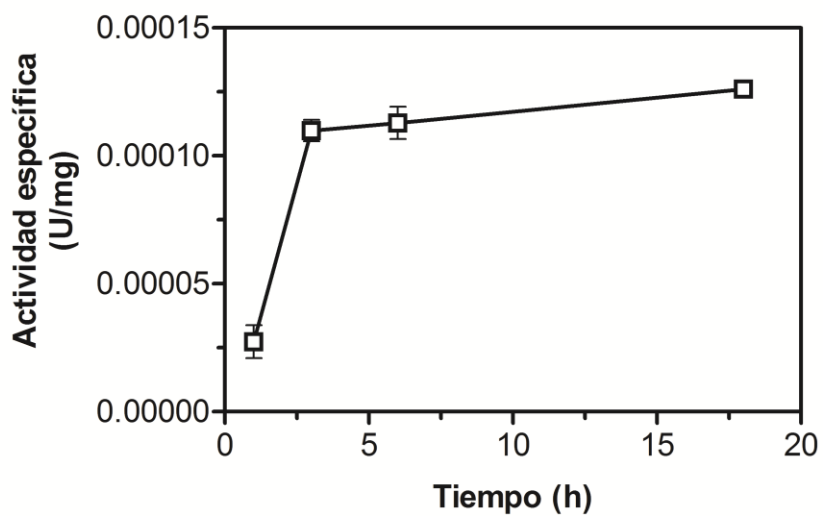


Figura 10. Actividad específica de mutante de tripsina III A233N. La inducción de la expresión de proteína fue a 25 °C y se utilizó BA $\rho$ NA como sustrato.

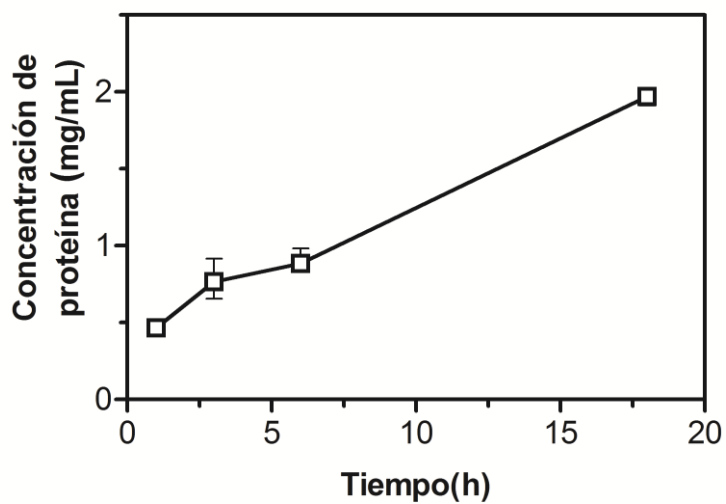


Figura 11. Cuantificación de proteína total al sobreexpresar mutante de tripsina III A233N. La inducción de la expresión de proteína fue a 25 °C.

### **Mutante de Tripsina III L234Y al Inducir la Expresión de Proteína a 25 °C**

De igual manera que la mutante de tripsina III A234Y antes mencionada, al inducir la expresión de proteína a 25 °C se observa la banda respectiva a la mutante de tripsina III L234Y en SDS-PAGE en 45 kDa de peso molecular (Figura 12). Se observa producción de proteína en la fracción soluble e insoluble, sin embargo, la banda que corresponde a la mutante L234Y se observa con mayor intensidad en la fracción insoluble. Además, conforme aumenta el tiempo de inducción, las bandas tanto de fracción soluble como insoluble se observan con mayor intensidad. Esto puede ser debido a que el incremento de la producción de proteína soluble e insoluble es proporcional al crecimiento celular.

En la Figura 13 se observa un incremento de actividad específica de  $3.69 \times 10^{-5}$  U/mg a  $1.19 \times 10^{-4}$  U/mg entre 1 a 3 h después de inducir la expresión de proteína. La actividad específica al terminar la sobreexpresión después de 18 h de inducción fue de  $1.36 \times 10^{-4}$  U/mg. Al comenzar la inducción de proteína el crecimiento de las bacterias es de forma exponencial, por lo tanto, la producción de proteína también incrementa. Al tener mayor cantidad de proteína, hay mayor actividad enzimática. Con excepción en 6 h después de inducir en el cual disminuyó, sin embargo, este dato tiene una desviación estándar considerable. A partir de 3 h después de inducir no se observa un incremento considerable de la actividad específica, esto podría deberse a que la mutante de tripsina III se autoactiva (Carretas-Valdez, 2014). Por lo tanto al haber mayor cantidad de mutante de tripsina III activa podría sufrir degradación autolítica, lo que repercute en la disminución de actividad específica.

Por otro lado, al igual que la mutante de tripsina A233N, en la Figura 14, se presenta un incremento de concentración de proteína de 0.83 mg/mL a 1.97 mg/mL entre 6 a 18 h después de inducir la expresión de proteína. Esto es debido a que al comenzar la inducción de proteína, el crecimiento de las bacterias es de forma exponencial, por lo tanto, de igual manera la producción de proteína incrementa.

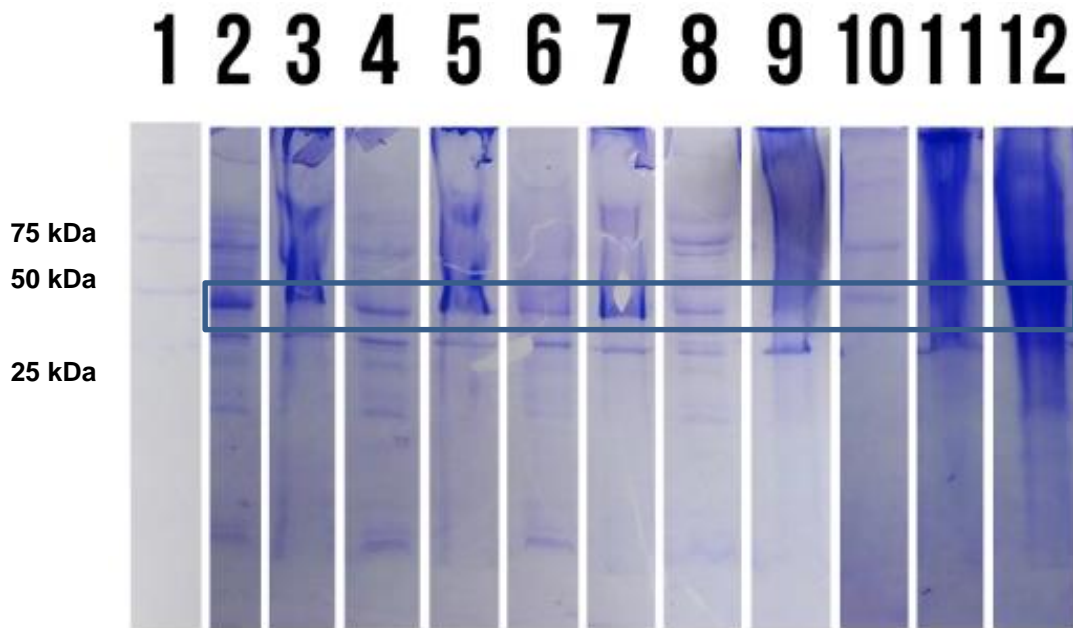


Figura 12. SDS-PAGE de mutante de tripsina III L234Y. La inducción de la expresión de proteína fue a 25 °C.

Carril:

- #1: marcador
- #2: Fracción insoluble antes de inducir
- #3: Fracción soluble antes de inducir
- #4: Fracción insoluble 1h después de inducir
- #5: Fracción soluble 1h después de inducir
- #6: Fracción insoluble 3h después de inducir

Carril:

- #7: Fracción soluble 3h después de inducir
- #8: Fracción insoluble 6h después de inducir
- #9: Fracción soluble 6h después de inducir
- #10: Fracción insoluble 18h después de inducir
- #11: Marcador
- #12: Fracción soluble 18h después de inducir.

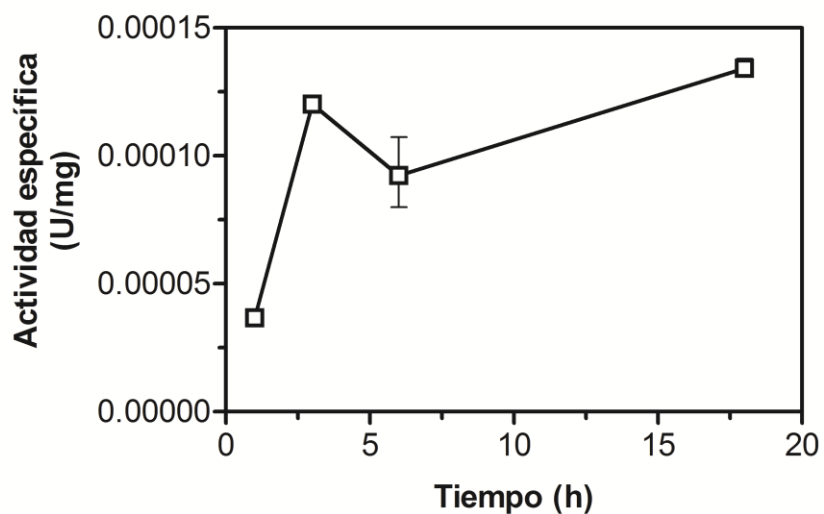


Figura 13. Actividad específica de mutante de tripsina III L234Y. La inducción de la expresión de proteína fue a 25 °C y se utilizó BA $\rho$ NA como sustrato.

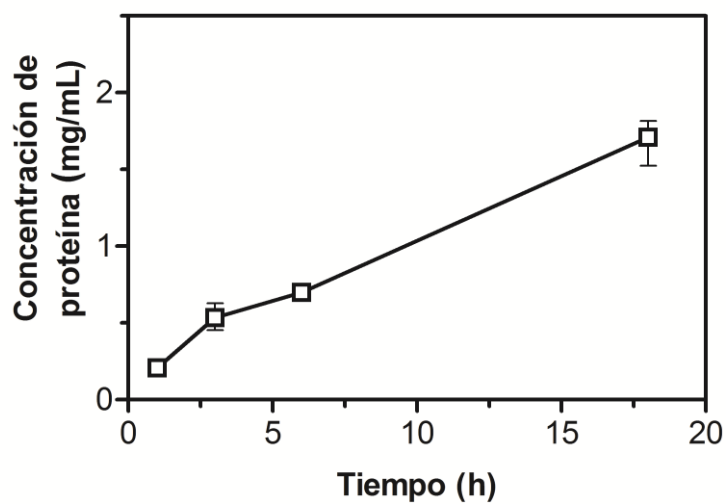


Figura 14. Cuantificación de proteína total al sobreexpresar mutante de tripsina III L234Y. La inducción de la expresión de proteína fue a 25 °C.



## **Comparación de Sobreexpresión de A233N y L234Y al Inducir a Distintas Temperaturas**

Haciendo una comparación en las figuras de 15 y 16 donde aparecen las mutantes de tripsina III: A233N (A) y L234Y (B) en SDS-PAGE al inducir la expresión de proteína a 20 °C y 16 °C, respectivamente, se puede observar que al igual que la inducción a 25 °C, la inducción a 20 °C aún presenta mayor producción de proteína insoluble que soluble.

Sin embargo, al inducir la proteína a 16 °C se observa mayor cantidad de fracción soluble que insoluble. Según Lara (2011) a menor temperatura de inducción suele plegarse mejor la proteína, evitando formar agregados insolubles y mejorando el rendimiento de proteína soluble. Además, es benéfico, ya que es más sencillo purificar la proteína deseada mediante la fracción soluble. Por lo contrario, para purificar la proteína en fracción insoluble se necesitan diversos métodos para lograrlo, lo cual se vuelve más complejo. De igual manera, conforme aumenta el tiempo de inducción de proteína las bandas que corresponden a las mutantes de tripsina III: A233N y L234Y se observan cada vez con mayor intensidad tanto en la fracción soluble insoluble.

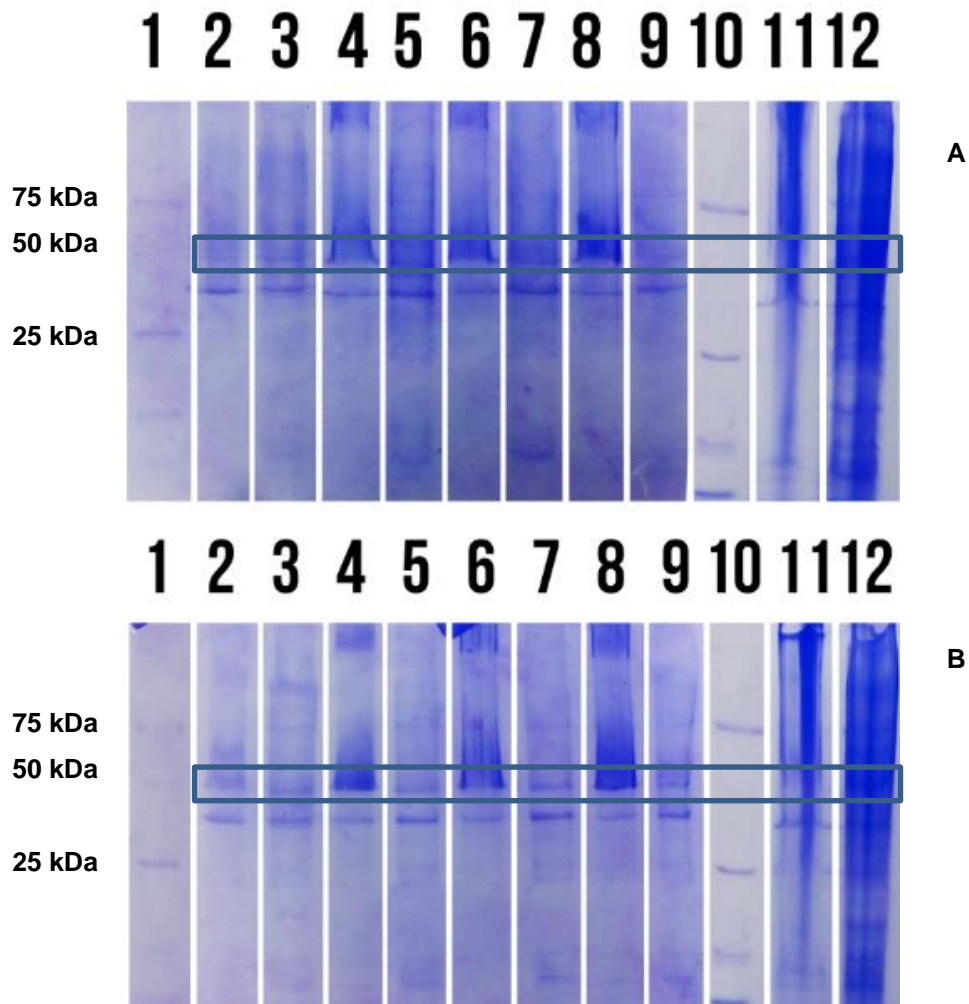


Figura 15. SDS-PAGE de mutantes de tripsina III A233N (A) y L234Y (B) al inducir la expresión de proteína a 20 °C.

Carril:

- #1: marcador
- #2: Fracción insoluble antes de inducir
- #3: Fracción soluble antes de inducir
- #4: Fracción insoluble 1h después de inducir
- #5: Fracción soluble 1h después de inducir
- #6: Fracción insoluble 3h después de inducir

Carril:

- #7: Fracción soluble 3h después de inducir
- #8: Fracción insoluble 6h después de inducir
- #9: Fracción soluble 6h después de inducir
- #10: Fracción insoluble 18h después de inducir
- #11: Marcador
- #12: Fracción soluble 18h después de inducir.

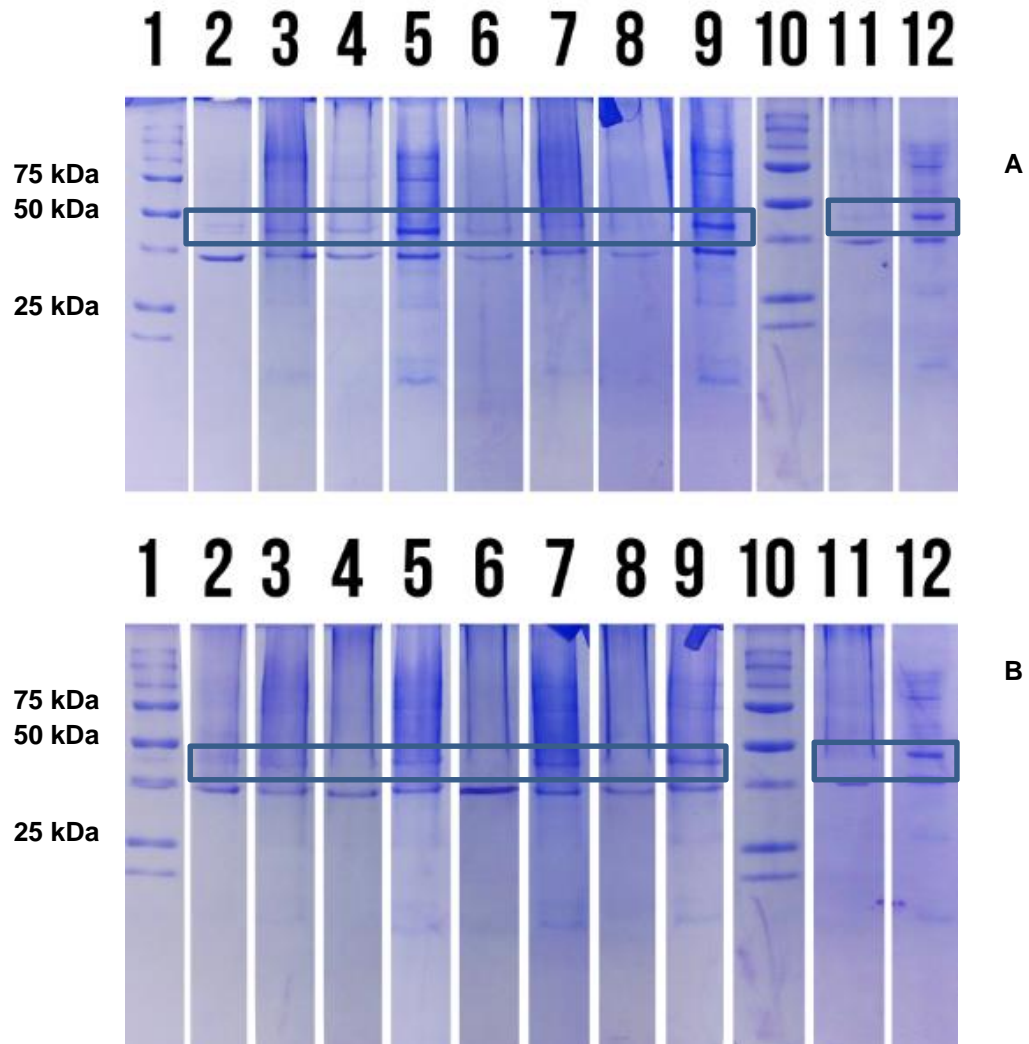


Figura 16. SDS-PAGE de mutantes de tripsina III A233N (A) y L234Y (B) al inducir la expresión de proteína a 16 °C.

Carril:

- #1: marcador
- #2: Fracción insoluble antes de inducir
- #3: Fracción soluble antes de inducir
- #4: Fracción insoluble 1h después de inducir
- #5: Fracción soluble 1h después de inducir
- #6: Fracción insoluble 3h después de inducir

Carril:

- #7: Fracción soluble 3h después de inducir
- #8: Fracción insoluble 6h después de inducir
- #9: Fracción soluble 6h después de inducir
- #10: Fracción insoluble 18h después de inducir
- #11: Marcador
- #12: Fracción soluble 18h después de inducir.

La Figura 17 muestra la actividad específica de ambas mutantes de tripsina III a diferentes temperaturas de inducción, las cuales son promedio de tres lecturas al tiempo final de inducción (18 h). En esta se observa una mayor actividad específica a la temperatura de 16 °C de inducción de proteína la cual fue de  $8.88 \times 10^{-4}$  U/mg y  $10.90 \times 10^{-4}$  U/mg en las mutantes A233N y L234Y de tripsina III, respectivamente. Esto es debido a que a bajas temperaturas de inducción, la proteína se pliega mejor, siendo soluble y activa (Lara, 2011).

Además, en un estudio realizado acerca de la tripsina I del bacalao del Atlántico, analizaron la pérdida de actividad de tripsina I con el fin de caracterizar la estabilidad térmica a tres temperaturas distintas. La vida media de tripsina I a 37 °C fue de 17 h, a 25 ° fue de 5.4 días, mientras que a 15 °C la enzima tiene mayor estabilidad con una vida media de 32.5 días. En base a lo anterior, se podría suponer que a menor temperatura de inducción la tripsina es más estable, por lo tanto, la enzima es más activa durante mayor tiempo (Stefansson y col., 2010).

Por tal motivo, y según los resultados de SDS-PAGE, se sugiere que a esta temperatura se obtiene mayor rendimiento en fracción soluble en comparación a la fracción insoluble y por lo tanto, se obtiene una mayor actividad enzimática, en comparación a la temperatura de 25 °C de inducción de proteína la cual fue de  $1.261 \times 10^{-4}$  U/mg y  $1.364 \times 10^{-4}$  U/mg en las mutantes A233N y L234Y de tripsina III respectivamente, ya que estas presentan mayor cantidad de fracción insoluble y menor actividad específica.

La actividad específica obtenida de ambas mutantes de tripsina III fue menor comparada con la actividad de tripsina III de sardina Monterey purificada de  $7.2 \times 10^{-3}$  U/mg (Carretas-Valdez, 2014). Esto podría deberse a que las mutantes de tripsina III estudiadas aún no han sido purificadas. Sin embargo, es posible que esta diferencia se atribuya a la mutación realizada.

En la Figura 18 se observa la concentración de proteína de ambas mutantes de tripsina III a diferentes temperaturas de inducción, las cuales son promedio de tres lecturas al tiempo final de inducción (18 h). Ambas mutantes, A233N y L234Y, de tripsina III presenta mayor concentración de proteína al inducir a una temperatura de 25 °C, 1.97 mg/mL y 1.71 mg/mL, respectivamente. Por el contrario, al inducir a 16 °C la producción de proteína es menor ya que el crecimiento de las bacterias de *E. coli* es más lento debido a que no se encuentra dentro del rango de su temperatura óptima de crecimiento, obteniendo una concentración de proteína de 1.52 mg/mL y 0.97 mg/mL en las mutantes A233N y L23Y respectivamente, ya que al tener menor cantidad de bacterias de *E. coli* se producirá menor cantidad de proteína recombinante.

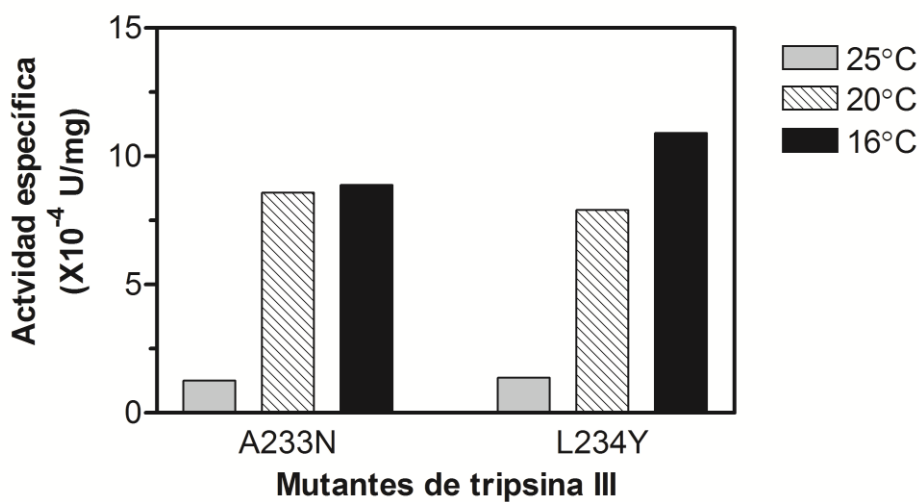


Figura 17. Actividad específica de mutantes de tripsina III A233N y L234Y a diferentes temperaturas de inducción. Las barras representan el promedio de tres lecturas al tiempo final de inducción (18 h).

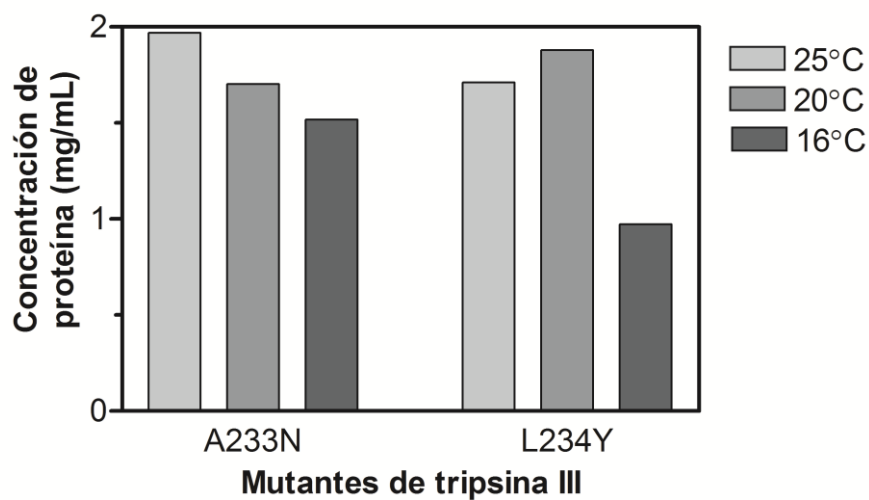


Figura 18. Cuantificación de proteína total al sobreexpresar mutantes de tripsina III A233N y L234Y a diferentes temperaturas de inducción. Las barras representan el promedio de tres lecturas tiempo final (18 h).

## CONCLUSIONES

La sobreexpresión de las mutantes de tripsina es afectada por la temperatura a la cual se induce la expresión de proteína y por la cepa utilizada de *Escherichia coli*. En el caso de la temperatura se observa mayor actividad enzimática y un mejor rendimiento de proteína en el extracto soluble al inducir la expresión de proteína a 16 °C. La cepa BL21 Gold produjo mayor concentración de proteína y presentó mayor actividad enzimática en comparación a la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) Origami. Por consiguiente, se concluye que se debe transformar *E. coli* BL21 Gold con el vector pET-32a que contiene mutante de tripsina III de sardina Monterey A233N o L234Y, sobreexpresar a 16 °C en medio LB suplementado con glucosa y ampicilina, e inducir la expresión de proteína con IPTG a una concentración de 0.5 mM durante un tiempo de 3 h.

## RECOMENDACIONES

Utilizar bacterias de *E. coli* BL21(DE3) pLysS para disminuir la expresión basal de proteína. Esta cepa produce además la lisozima del bacteriófago T7, la cual inactiva a la T7 RNA polimerasa y por consiguiente, inhibe la inducción basal de proteína heteróloga, excepto cuando se realiza la inducción por IPTG.

Sobreexpresar en mayor volumen utilizando la cepa *E. coli* BL21 Gold en medio LB suplementado con glucosa y ampicilina, e inducir la expresión de proteína a 16 °C con IPTG a una concentración de 0.5 mM durante un tiempo de 3 h para purificar mutantes de tripsina III A233N y L234Y.

Investigar acerca del mecanismo de autoactivación de tripsinas recombinantes haciendo un ensayo después de la sobreexpresión, en el cual se mida el incremento de la actividad específica de tripsina frente al sustrato BApNA respecto al tiempo de incubación.

Investigar la relación entre estructura y función en mutantes de tripsina III.



## REFERENCIAS

Agilent Technologies. 2015. QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit. Disponible en: <http://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/Public/200523.pdf>

Arvizu-Flores AA, Quintero-Reyes IE, Felix-Lopez M, Islas-Osuna, MA, Yepiz-Plascencia G, Pacheco-Aguilar R, Navare A, Fernández FM, Velazquez-Contreras EF, Sotelo-Mundo RR, Castillo-Yañez FJ. 2012. Thermodynamic activation and structural analysis of trypsin I from Monterey sardine (*Sardinops sagax caerulea*). Food Chemistry. 133(3):898–904.

Bougatef A, Souissi N, Fakhfakh N, Ellouz-Triki Y, Nasri M. 2007. Purification and characterization of trypsin from the viscera of sardine (*Sardina pilchardus*). Food Chemistry. 102(1):343-350.

Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry. 72(1-2):248-254.

Carretas-Valdez MI. 2014. Caracterización bioquímica de tripsina III de sardina Monterey (*sardinops sagax caerulea*). Tesis de maestría. Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos. Universidad de Sonora.

Carretas-Valdez MI. En preparación. Tesis de doctorado. Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos. Universidad de Sonora.

Castillo-Yañez FJ, Pacheco-Aguilar R, Garcia-Carreño FL, Navarrete-Del Toro MA. 2004. Characterization of acidic proteolytic enzymes from Monterey sardine (*Sardinops sagax caerulea*) viscera. Food Chemistry. 85(3):343-350.

Castillo-Yañez FJ, Pacheco-Aguilar R, García-Carreño FL, Navarrete-Del Toro MA. 2005. Isolation and characterization of trypsin from pyloric caeca of Monterey sardine *Sardinops sagax caerulea*. Comparative Biochemistry and Physiology. B 140:91-98.

Castro RC, Díaz-Gómez J, Pulido D, Acosta O, Guerrero CA. 2006. Producción de la proteína de choque térmico HSC70 recombinante en *Escherichia coli* BL21(DE3) para generar anticuerpos policlonales. Revista de la Facultad de Medicina, 54(3), 156-168.

Disponible en:

[http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0120-00112006000300002&lng=en&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-00112006000300002&lng=en&tlng=es).

Di Cera E. 2009. Serine proteases. IUBMB Life. 61(5):510-515.

Erlanger BF, Kokowsky N, Cohen W. 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. Archives of Biochemistry and Biophysics. 95:271-8.

Green MR, Sambrook J. 2012. Molecular cloning. 4th ed. New York: Cold spring harbor laboratory press. Vol. 1, 162-167 p.

Gudmundsdóttir Á, Pálsdóttir HM. 2005. Atlantic cod trypsins: from basic research to practical applications. Marine Biotechnology. 7(2):77-88.

Guevara-Hernández E, López-Zavala AA, Jiménez-Gutiérrez LR, Sotelo-Mundo RR. 2013. Perspectivas actuales del uso de proteínas recombinantes y su importancia en la investigación científica e industrial. Biotecnia. 15(3):8-17.

Hogrefe HH, Cline J, Youngblood GL, Allen RM. 2002. Creating randomized amino acid libraries with the QuikChange® multi site-directed mutagenesis kit. Biotechniques. 33(5):1158-1165.

Isaksen GV, Åqvist J, Brandsdal BO. 2014. Protein surface softness is the origin of enzyme cold-adaptation of trypsin. PLOS Computational Biology. 10(8):e1003813.

Jónsdóttir G, Bjarnason JB, Gudmundsdóttir Á. 2004. Recombinant cold-adapted trypsin I from Atlantic cod—expression, purification, and identification. Protein Expression and Purification. 33(1):110-122.

Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227:680-685.

Lara AR. 2011. Producción de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 10(2):209-223.

Leiros HK, Willassen NP, Smalas AO, 2000. Structural comparison of psychrophilic and mesophilic trypsins. Elucidating the molecular basis of cold-adaptation. *European Journal of Biochemistry*. 267:1039-1049.

Mikhailova AG, Rumsh LD, Dalgarrondo M, Chobert JM, Haertle T. 2003. Activities of Anionic and Cationic Trypsins in the Temperature Range from 5 to 37° C. Mutant Anionic Trypsins as a Model of Cold-Adapted (Psychrophilic) Enzymes. *Biochemistry (Moscow)*. 68(8):926-933.

Novagen. 2006. pET System Manual. 11a edición. EMD Biosciences, Inc. Darmstadt, Germany. Disponible en: [http://kirschner.med.harvard.edu/files/protocols/Novagen\\_petsystem.pdf](http://kirschner.med.harvard.edu/files/protocols/Novagen_petsystem.pdf)

EMD milipore. pET-32a-c(+) Vectors. Disponible en: [http://www.emdmillipore.com/US/en/product/pET-32a\(%2B\)-DNA---Novagen,EMD\\_BIO-69015#anchor\\_VMAP](http://www.emdmillipore.com/US/en/product/pET-32a(%2B)-DNA---Novagen,EMD_BIO-69015#anchor_VMAP)

Pálsdóttir HM, Gudmundsdóttir A. 2007. Expression and purification of a cold-adapted group III trypsin in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*. 51(2):243-252.

Rypniewski WR, Perrakis A, Vorgias CE, Wilson KS. 1994. Evolutionary divergence and conservation of trypsin. *Protein Engineering*. 7(1):57-64.

[SIAP]. 2015. Infografía agroalimentaria de Sonora 2015. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. México, DF.

Stefansson B, Helgadóttir L, Olafsdóttir S, Guðmundsdóttir Á, Bjarnason JB. 2010. Characterization of cold-adapted Atlantic cod (*Gadus morhua*) trypsin I—Kinetic parameters, autolysis and thermal stability. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 155(2):186-194.

Studier FW, Moffatt BA. 1986. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of Molecular Biology*. 189(1):113–130.