



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA APLICADA
(CIBA TLAXCALA)**

“INSERCIÓN DE PEPTIDOS BIOACTIVOS EN LAS REGIONES
VARIABLES DE UNA GLOBULINA 11S DE AMARANTO”

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:
M. en C. EDGAR ESPINOSA HERNÁNDEZ

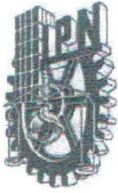
DIRECTORA DE TESIS:
DRA. SILVIA LUNA SUÁREZ

CO-DIRECTORA DE TESIS:
DRA. CLAUDIA G. BENÍTEZ CARDOZA



TEPETITLA DE LARDIZÁBAL, TLAXCALA, MÉXICO.

DICIEMBRE 2018.



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REGISTRO DE TEMA DE TESIS Y DESIGNACIÓN DE DIRECTORES DE TESIS

México, D.F. a 13 de Septiembre del 2013

El Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIBA-IPN en su sesión ordinaria No. 8 celebrada el día 13 del mes de Septiembre conoció la solicitud presentada por el(la) alumno(a):

<u>Espinosa</u>	<u>Hernández</u>	<u>Edgar</u>								
Apellido paterno	Apellido materno	Nombre (s)								
Con registro:			<table border="1"> <tr> <td>A</td> <td>1</td> <td>3</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>8</td> <td>2</td> </tr> </table>	A	1	3	0	0	8	2
A	1	3	0	0	8	2				

Aspirante de:

1.- Se designa al aspirante el tema de tesis titulado:
"Inserción de péptidos bioactivos en las regiones variables de una globulina 11S de amaranto"

De manera general el tema abarcará los siguientes aspectos:

- Diseño y construcción de la proteína modifica por técnicas de biología molecular.
- Expresión de las proteínas modificadas en *E. coli* y su purificación.
- Caracterización y determinación comparativa del tipo de plegamiento de la proteína modificada.

2.- Se designan como Directores de Tesis a los Profesores:
Dra. Silvia Luna Suárez y la Dra. Claudia Guadalupe Benítez Cardoza

3.- El trabajo de investigación base para el desarrollo de la tesina será elaborado por el alumno en:
CIBA-IPN


que cuenta con los recursos e infraestructura necesarios.

4.- El interesado deberá asistir a los seminarios desarrollados en el área de adscripción del trabajo desde la fecha en que se suscribe la presente hasta la aceptación de la tesis por la Comisión Revisora correspondiente:

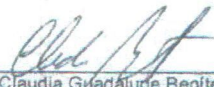
Directores de Tesis



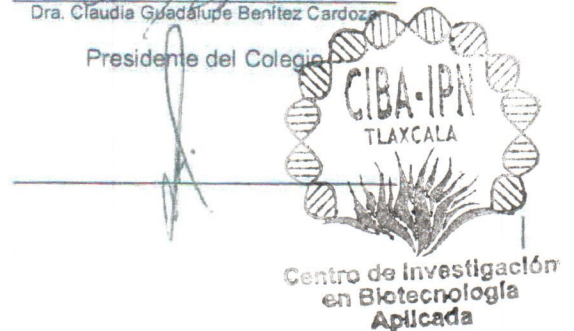
Dra. Silvia Luna Suárez

Aspirante


M.C. Edgar Espinosa Hernández



Dra. Claudia Guadalupe Benítez Cardoza
Presidente del Colegio





INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Tepetitla siendo las 10 horas del día 23 del mes de noviembre del 2018 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIBA para examinar la tesis titulada:

Inserción de péptidos bioactivos en las regiones variables de una globulina 11S de amaranto

Presentada por el alumno:

Espinosa

Apellido paterno

Hernández

Apellido materno

Edgar

Nombre(s)

Con registro:

A	1	3	0	0	8	2
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

Doctorado en Ciencias en Biotecnología

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

Dra. Silvia Luna Suárez

Dra. Claudia Benítez Cardoza

Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco

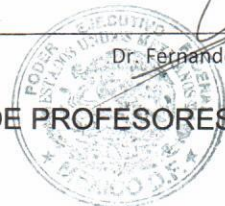
Dra. Flor de Fátima Rosas Cárdenas

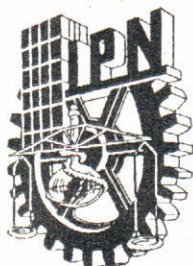
Dr. Víctor Eric López y López

Dr. Fernando López Valdez

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

Dra. María Myrna Solís Oba





INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de Tepetitla de Lardizabal, Tlaxcala, el día 5 del mes diciembre del año 2018, el que suscribe Edgar Espinosa Hernández, alumno del Programa de Doctorado en Ciencias en Biotecnología con número de registro A130082, adscrito al Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dra. Silvia Luna Suárez y cede los derechos del trabajo intitulado “Inserción de péptidos bioactivos en las regiones variables de una globulina 11S de amaranto”, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: Ex-hacienda San Juan Molino, carretera estatal Tecuexcomac-Tepetitla Km 1.5, Tlaxcala, México, C.P. 90700. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Dr. Edgar Espinosa Hernández

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL.....	I
ÍNDICE DE CUADROS.....	III
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IV
AGRADECIMIENTOS.....	V
RESUMEN.....	VI
SUMMARY.....	VII
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	2
2.1 PRESIÓN SANGUÍNEA.....	2
2.2 SISTEMA RENIN-ANGIOTENSINA.....	2
2.3 CARACTERÍSTICAS DE LA ENZIMA ECA.....	4
2.4 PÉPTIDOS BIOACTIVOS.....	5
2.5 PROTEINAS RECOMBINANTES.....	6
2.6 ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA.....	7
Fluoróforos.....	7
Fundamento.....	8
Análisis estructural de las proteínas.....	9
2.7 DICROISMO CIRCULAR.....	12
Principios básicos.....	12
Mediciones de Dicroísmo Circular.....	14
Aplicaciones del dicroísmo circular.....	15
Espectro de proteínas en el UV-lejano.....	16
Estudios de DC a diferentes temperaturas: control de temperatura.....	17
Preparación de la muestra.....	19
Procesamiento de datos.....	21
2.8 GLOBULINAS 11S.....	22
2.9 AMARANTINA.....	23
Modificación de la subunidad ácida de la amarantina.....	24
Modificación de la amarantina completa.....	25
3. JUSTIFICACIÓN.....	26

4. HIPÓTESIS.....	26
5. OBJETIVO GENERAL	26
6. OBJETIVOS PARTICULARES.....	26
7. MATERIALES Y MÉTODOS	27
7.1. FORMULACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO.	27
7.2. CONSTRUCCIÓN DE PLÁSMIDOS.....	28
7.3. EXPRESIÓN DE PROTEÍNA MODIFICADA.....	28
7.4. SOLUBILIZACIÓN DE PROTEÍNA MODIFICADA INSOLUBLE.	30
7.5. PURIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS MODIFICADAS.....	30
7.6. REPLEGAMIENTO <i>IN VITRO</i> DE PROTEÍNAS MODIFICADAS.	30
7.7. ANALISIS ESPECTROMÉTRICO	31
7.8. ANÁLISIS DE ESTABILIDAD TÉRMICA Y QUÍMICA.	31
7.9. ACTIVIDAD INHIBITORIA DE LA ECA	32
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	33
8.1. DISEÑO DE UN MEDIO DE CULTIVO A BASE DE INFUSIÓN DE PAPA	33
8.2. CONSTRUCCIÓN DE LAS PROTEÍNAS MODIFICADAS.....	36
8.3. EXPRESION DE LAS PROTEÍNAS MODIFICADAS.....	37
8.4. PURIFICACIÓN DE LAS PROTEINAS MODIFICADAS.....	39
8.5. REPLEGAMIENTO <i>in vitro</i>	40
8.6. ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA.....	41
8.7. ESPECTROSCOPIA DE DICROISMO CIRCULAR	44
8.8. DESNATURALIZACION TÉRMICA.....	45
8.9. DESNATURALIZACIÓN QUÍMICA	46
8.10. PUNTO ISOELECTRICO	46
8.11. ACTIVIDAD ANTIHIPERTENSIVA.....	47
9. CONCLUSIONES	48
10. LITERATURA CITADA.....	49
APÉNDICE A.....	52
APÉNDICE B.....	53

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Descripción	Página
1	Características de fluorescencia de los aminoácidos aromáticos	10
2	Fluorescencia de los aminoácidos libres e insertos en una proteína.	12
3	Componentes de los medios de cultivos formulados a base de infusión de papa.	28
4	Oligonucleótidos correspondientes para la construcción de cada versión las proteínas modificadas y para la detección del inserto.	29
5	Rendimiento de proteínas purificadas.	40
6	Porcentaje de recuperación de proteína replegada.	41
7	Secuencia de aminoácidos del extremo carboxilo terminal de las proteínas recombinantes AM y R5. S: hidrófilo. I: hidrófobo.	41
8	Emisiones de fluorescencia máxima en urea 6M y buffer de fosfatos.	42
9	Centro espectral de masas de las proteínas modificadas.	44
10	Predicción de la estructura secundaria de las proteínas recombinantes.	45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Descripción	Página
1	Sistema de regulación RAS de la presión arterial.	3
2	Diagrama de Perrin-Jablonski	9
3	Efecto del solvente en la fluorescencia del triptófano de la MccJ25-Trp.	11
4	Luz polarizada circularmente, a la izquierda y derecha, propagándose en el espacio.	13
5	Representación de la luz polarizada desde un punto fijo.	13
6	Origen del efecto del Dicroísmo Circular.	14
7	Estrategia experimental	27
8	Expresión de una globulina 11S modificada de amaranto expresada en medios de cultivo a base de infusión de papa y otro componente.	34
9	Expresión de una globulina 11S modificada de amaranto expresada en medios de cultivo a base de infusión de papa y otros dos componentes.	35
10	SDS-PAGE de la expresión de AMR5 que produce <i>E. coli</i> en medio FPW en cantidades distintas de extracto de levadura	36
11	Representación esquemática y secuencia de aminoácidos de la 11S globulina de amaranto.	37
12	Perfil electroforético SDS-PAGE y Western blot de la globulina 11S de amaranto y sus versiones modificadas expresadas en <i>E. coli</i>	39
13	Espectros de fluorescencia de las proteínas recombinantes.	43
14	Espectros de dicroísmo circular de las proteínas recombinantes	45
15	Espectro de dicroísmo circular de R3 y R5 con rampa de temperatura de 20-95°C.	46
16	Desnaturalización química seguida por espectroscopía de fluorescencia.	46
17	Punto isoeléctrico de la proteína R5.	47

AGRADECIMIENTOS

A Dios porque me dio la vida, una familia, un hogar, amigos, innumerables bendiciones y siempre guía mi camino.

A la Dra. Silvia Luna Suárez, quien me ofreció su confianza para desarrollar este proyecto, y contribuyó con su asesoramiento en mi formación como investigador.

Al Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco, por compartirme su experiencia y conocimientos.

A la Dra. Claudia Guadalupe Benítez Cardoza, por su apoyo y asesoría en todo momento.

A la Dra. Flor de Fátima Rosas Cárdenas y el Dr. Víctor Eric López y López, por su ayuda y comentarios para mejorar este proyecto.

A mi familia que siempre incondicionalmente me ha apoyado y que es la base de una sana superación en cada individuo.

A los amigos que conocí en este centro de investigación, que me brindaron su amistad y su apoyo.

Al CONACYT, por la beca asignada para desarrollar los estudios de posgrado.

RESUMEN

La globulina 11S de amaranto es la más abundante proteína de almacenamiento en semillas maduras y es ampliamente reconocido por su valor nutricional. En este estudio, esta proteína se le ha insertado cuatro pares del péptido valina-tirosina en cada una de las regiones variables, generando cinco proteínas modificadas. Cada una de estas proteínas fueron expresadas en *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL en el medio F8PW diseñado en este estudio para la producción de proteínas recombinantes. Después de purificar estas proteínas fueron analizadas por espectroscopía de fluorescencia y dicroísmo circular, así como su estabilidad a la desnaturalización térmica y química. Las inserciones en las regiones variables afectaron en la expresión de las proteínas observando un mayor rendimiento de la proteína sin modificar. Las proteínas modificadas mantienen la estructura Beta I como la que presenta la proteína nativa, sin embargo, la modificación de la región II, III, IV y V, modifica el patrón de plegamiento *in vitro* de la proteína nativa. Las inserciones en las regiones III y V cambian la estabilidad térmica de la globulina 11S de amaranto. La proteína R5 forma una estructura ordenada diferente a la proteína nativa y al ser digerida por proteasas digestivas liberan los péptidos bioactivos VY presentando actividad funcional *in vitro*.

SUMMARY

The amaranth 11S globulin is the most abundant storage protein in mature seeds and is widely recognized for its nutritional value. In this study, this protein has been inserted four pairs of valine-tyrosine peptide in each of the variable regions, constructing five modified proteins. Each of these proteins was expressed in *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3) –RIL strain in the F8PW medium which it was designed in this study for the production of recombinant proteins. After purifying these proteins, they were analyzed by fluorescence and circular dichroism spectroscopy, as well as their stability to thermal and chemical denaturation. The bioactive peptide insertions in the variable regions affected the expression of the proteins, observing a higher yield of the unmodified protein. The modified proteins maintained the beta I structure as the one presented by the native protein, however, the modification in the regions II, III, IV and V, modifies the *in vitro* refolding pattern. The insertions in regions III and V change the thermal stability of 11S amaranth globulin. The R5 protein acquired an arranged structure different to the native protein and the bioactive peptides presented *in vitro* functional activity after that protein were digested by digestive proteases.

1. INTRODUCCIÓN

Las proteínas son parte esencial de la alimentación y las semillas constituyen la principal fuente de origen vegetal para la alimentación humana debido a su bajo costo, facilidad de almacenamiento y distribución. Entre éstas proteínas de reserva se encuentran las globulinas 11S, que han sido objeto de múltiples estudios, encaminados a la modificación de su valor nutrimental y funcional. La amarantina es la proteína de reserva más abundante en la semilla de amaranto, de su estructura secundaria y terciaria se han reportado cinco regiones variables que sugieren pueden ser modificadas sin alterar la síntesis, el correcto plegamiento y la función intrínseca de esta proteína (Tandang-Silvas y col., 2012).

Por otro lado, se conocen algunos péptidos con actividad biológica benéfica en humanos, al ser liberados mediante digestión e ingresados al torrente sanguíneo. Por ejemplo, se ha reportado que el biopéptido Valina-Tirosina (VY) tiene un efecto antihipertensivo, inhibiendo a la Enzima Convertidora de Angiotensina (ECA), comprobado *in vitro* como *in vivo* en modelos animales y en humanos (Kawasaki y col., 2000).

En México se estima que el 33.3% de la población (alrededor 22.4 millones de personas) padecen de hipertensión arterial (ENSANUT, 2017). Por lo que el diseño de un alimento nutraceutico que aporte nutrientes y además tenga la propiedad biológica de ayudar a contrarrestar los efectos negativos de la hipertensión arterial, puede ser una buena alternativa para la población afectada por esta enfermedad, al reducir el consumo de fármacos antihipertensivos, lo cuales provocan efectos secundarios y además, generar un ahorro en el tratamiento de esta enfermedad para el sector salud. En este trabajo se pretende la inserción del péptido VY en cinco regiones variables de la globulina 11S de amaranto, para comparar los efectos que provoca esta modificación en la expresión de la proteína en *E. coli*, midiendo variables como el rendimiento y solubilidad de la proteína modificada. Esta información será útil para plantear una estrategia adecuada hacia el diseño de un alimento antihipertensivo.

2. ANTECEDENTES

2.1 PRESIÓN SANGUÍNEA

La presión sanguínea es controlada por diferentes rutas bioquímicas, se considera que el principal regulador es el sistema RAS (de sus siglas en ingles renin-angiotensin system), sin embargo, existen otros reguladores como el sistema KNOS (de sus siglas en ingles kinin-nitric oxide system), el sistema neutral endopeptidasa y el sistema ECES (de sus siglas en ingles endothelin-converting enzyme system) el cual genera péptidos vasoreguladores de manera independiente a ACE. Cada uno de estos sistemas de regulación genera una variedad de péptidos que en conjunto modulan la presión sanguínea, el fluido, el balance electrolítico a través de la unión de receptores de membrana en diferentes tejidos y órganos. También la presión sanguínea puede ser afectada por el aumento o descenso del volumen de sangre en los vasos sanguíneos o por obstrucción de estos.

2.2 SISTEMA RENIN-ANGIOTENSINA

El sistema RAS es el principal regulador de la presión sanguínea, el balance electrolítico, renal, neuronal y funciones endócrinas asociadas al control cardiovascular. En la figura 1 se muestra el sistema RAS, el cual comienza con el angiotensinógeno un glicopéptido inactivo, con un peso molecular de 60 kDa, que se distribuye en los tejidos del cuerpo, el plasma sanguíneo y fluido cerebroespinal. La renina es una proteinasa de 350 aminoácidos que proviene de su precursor inactivo la prorenina por la acción de la calicreina. La principal fuente de renina, son las células juxtaglomerulares del hígado siguiéndole la glándula submaxilar y el fluido amniótico. Existen muchos factores que influyen en la liberación de la renina como es la presión por perfusión renal, perdida de sales y la estimulación de los receptores B2 por la aldosterona.

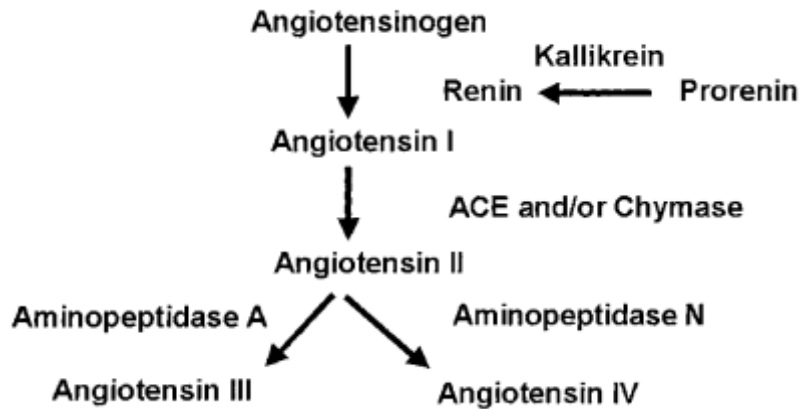


Figura 1. Sistema de regulación RAS de la presión arterial.

La renina es responsable de la liberación de la angiotensina I a partir del angiotensinógeno, el cual se encuentra en el plasma sanguíneo a una concentración a la cual no es posible saturar a la renina, por lo que los cambios en la concentración de angiotensinógeno podrían influir en la producción de Angiotensina I y posteriormente Angiotensina II.

La Angiotensina I, es un decapeptido que ha sido localizado en el plasma sanguíneo y en la mayoría de los órganos del cuerpo, como el cerebro, corazón, pulmones, riñones y el aparato reproductivo. La angiotensina I es sustrato de la enzima ECA (Enzima Convertidora de Angiotensina) removiendo el dipéptido HL (Histidina-Leusina) de su carbono terminal, formando el péptido angiotensina II, el cual es un potente vasoconstrictor. ECA también remueve el dipéptido del carbono terminal de la Bradiquinina (un potente vasodilatador), provocando la formación de un péptido inactivo. Los niveles de la angiotensina II y la bradiquinina están dirigidos por la enzima ECA e influye en la regulación de la presión sanguínea periférica.

La liberación de la Angiotensina II induce respuestas en ciertos órganos que tienen sus receptores AT1, AT2 y AT3 activados. El principal efecto de la angiotensina II es el control de la presión arterial, el volumen sanguíneo, las interacciones neurotransmisoras y sobre la actividad de la hormona Gn-RH que libera gonodotropinas y otras hormonas.

La Angiotensina II es sustrato de varias enzimas lo cual genera péptidos con diferentes actividades biológicas. Por ejemplo, la aminopeptidasa A y la aminopeptidasa N forman angiotensina III y IV respectivamente. La Quimasa que se encuentra en los mastocitos y endotelio de corazón, convirtiendo Angiotensina I a Angiotensina II. En el ventrículo izquierdo del corazón la quimasa se encuentra en su forma más activa en la formación de Angiotensina II y en otros compartimientos del corazón domina la actividad de ECA en la formación de Angiotensina II. Como un sistema de autoregulación la Angiotensina II puede inhibir a la renina.

2.3 CARACTERÍSTICAS DE LA ENZIMA ECA

La enzima ECA es una metalocarboxipeptidasa dependiente del ion de cloro. Se han identificado tres isoformas: la somática (sECA), la germinal (gECA) y una homóloga denominada ECA2. Estas enzimas pueden estar localizadas en la superficie de las células endoteliales en distintos órganos, músculo esquelético, glándula suprarrenal y placenta.

La sECA es una peptidasa transmembranal la cual se une a la superficie externa de la membrana plasmática celular por medio de dominios de anclaje hidrofóbico y se puede liberar la enzima en el plasma sanguíneo a través de una actividad de excreción.

La enzima sECA y gECA contiene 2 y 1 sitios activos respectivamente, la ECA2 contiene 1 solo sitio activo y tiene la capacidad de hidrolizar angiotensina I y angiotensina II, pero no modifica a la bradiquinina. Los péptidos sustratos de ECA deben contener libre el anión carboxilato en su extremo terminal, el cual se debe anclar a un grupo básico cargado positivamente y el sitio de corte debe estar en yuxtaposición al ión Zn^{2+} en el sitio activo.

2.4 PÉPTIDOS BIOACTIVOS

Los alimentos se consideran reservorios de energía y componentes básicos para el mantenimiento y crecimiento del cuerpo, aunado a esto, también pueden ser una fuente de compuestos con actividad biológica benéficos para la salud humana, la mayoría de estos compuestos son los péptidos bioactivos, los cuales se definen como aquellos residuos de aminoácidos de 2-20, que tienen una respuesta fisiológica ejerciendo un papel en la regulación y modulación metabólica, dependiendo de su secuencia estos péptidos pueden presentar actividad opioide, inmunomoduladora, antimicrobiana, transportadora de iones, antioxidante, antitrombótica y antihipertensiva. Generalmente estos péptidos se encuentran inactivos dentro de una proteína nativa y pueden ser liberadas por hidrólisis química o enzimática durante la digestión gastrointestinal o durante el procesamiento de alimentos. Después de la digestión, los péptidos pueden ser absorbidos en el intestino delgado e ingresar al torrente sanguíneo ejerciendo su efecto sistémico (Hartmann y col. 2007).

Entre los diferentes tipos de péptidos bioactivos, los que presentan actividad antihipertensiva han ganado gran importancia debido al aumento de la incidencia de esta enfermedad en la población y porque esta es uno de los mayores factores de riesgo para las enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares, que pueden dar inicio a la insuficiencia renal. En México el 30% de los adultos presentan hipertensión arterial (mayor a 140/90 mmHg) y el 30% de las personas son obesas (ENSANUT, 2017). La Organización Mundial de la Salud estima que para el 2020 estas enfermedades sobrepasarán las enfermedades infecciosas para llegar a ser la principal causa de muerte y discapacidad en el mundo (WHO, 2017).

Actualmente se conocen diversos péptidos con actividad hipertensiva que se han reportado como péptidos capacidad inhibitoria de la ECA, que juegan un papel importante en la regulación de la presión arterial (Daskaya y col. 2017). Se han probado su actividad antihipertensiva *in vivo* en ratas hipertensas innato homocigotas (Martin y col., 2017) y en humanos (Matsui y col. 2002; Foltz y col., 2007). Una observación importante de los ensayos de actividad antihipertensiva *in*

vivo, es que los péptidos antihipertensivos que se han estudiado tienen poco o ningún efecto secundario en individuos sanos y no altera la presión arterial de los sujetos normotensos (Martin y Deussen, 2017).

El péptido bioactivo VY es un péptido con actividad antihipertensiva que fue encontrado en músculo de sardina (Matsui y col., 1993) y se observó en ratones transgénicos con el gen de humano de la renina, una reducción de la presión arterial a las 11 semanas, con un efecto de hasta 9 horas después de su ingestión (Matsui y col., 1993). En humanos con mediana presión arterial que ingieren una dosis de 3 mg del péptido VY/día, se observa una reducción de 5 a 10 mmHg de presión sanguínea (Kawasaki y col., 2000).

2.5 PROTEINAS RECOMBINANTES

En ingeniería genética o tecnología del ADN recombinante ha sido la herramienta principal para la producción de proteínas recombinantes. Esta tecnología ha tomado en los últimos tiempos una gran relevancia. Con la posibilidad de producir proteínas de importancia médica o industrial a través de microorganismos de fácil manipulación genética y eficiencia productiva para contener y producir un gen distinto al de su genoma. Los organismos más utilizados han sido desde bacterias (las más comunes), levaduras, algas, cultivo de tejidos de plantas y células de insecto y mamíferos).

E. coli ha sido el organismo más utilizado para la producción de proteínas recombinantes, ya que esta bacteria crece rápidamente, a altas densidades, en medios de cultivo simples, de fácil manejo, es fácil de modificar genéticamente encontrándose disponibles diferentes tipos de vectores y cepas de expresión, tiene las tasas más altas de productividad en la producción de proteínas recombinantes, con una acumulación posible de hasta 80% de su peso seco. Todas estas características se ven reflejado en la obtención de proteínas recombinantes a un relativo bajo costo. Sin embargo, los medios de cultivo disponibles para el crecimiento de *E. coli* tiene un costo alto, por lo que es importante buscar fuentes

alternativas de nitrógeno y carbono disponibles en México, que permitan reducir el costo de este insumo.

2.6 ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

La Fluorescencia es un fenómeno físico mediante el cual ciertas sustancias absorben energía en forma de radiación electromagnética emitiéndola en una longitud de onda mayor en un periodo de tiempo muy corto. La luz puede ser absorbida y emitida por ciertos compuestos y a este proceso se lo denomina luminiscencia. En la fluorescencia el tiempo entre la absorción y emisión de la luz es del orden de 10^{-8} segundos, y dura únicamente mientras existe el estímulo, es un fenómeno virtualmente instantáneo. La espectroscopia de fluorescencia es un método muy usado por su alta sensibilidad, por la caracterización y desarrollo de distintos fluoróforos, usada en: estudios de dinámica molecular, análisis estructural de proteínas, cuantificación de iones en compartimentos celulares, microscopía, análisis de potencial de membrana, interacciones entre macromoléculas, etc. Comparada con la espectroscopia de absorción, la sensibilidad de los métodos basados en fluorescencia es 10 a 10.000 veces mayor, esto significa que se pueden analizar nano gramos a pico gramos de diversos analitos con muy buenos resultados, además es posible identificar moléculas específicas en matrices complejas, sin embargo, su uso es limitado a la relativamente poca cantidad de sistemas químicos que exhiben fluorescencia o al uso de sondas fluorescentes que se unen a grupos funcionales específicos en la molécula en estudio.

Fluoróforos

La fluorescencia es el resultado de una serie de procesos que ocurren en ciertas moléculas llamadas fluoróforos. Dichas moléculas son generalmente orgánicas poli aromáticas o heterociclos. Los átomos son generalmente no fluorescentes, pero una notable excepción son los lantánidos, por ejemplo, europio o terbio, cuya fluorescencia resulta de la transición electrónica entre orbitales f . Los fluoróforos se pueden dividir en dos clases generales: extrínsecos e intrínsecos. Se denomina fluoróforo intrínseco a aquel que por sí mismo presenta fluorescencia. Por ejemplo

el grupo indol del triptófano en las proteínas. Un fluoróforo extrínseco es aquel que se agrega a una muestra que no presenta fluorescencia. Por ejemplo el 1,6-difenil-1,3,5 hexatrieno (DPH) que se utiliza para medir fluidez de membranas, las cuales no presentan fluorescencia.

Fundamento

Cuando el fluoróforo absorbe luz uno de sus electrones pasa a un estado excitado (de **mayor energía**) que es inestable y al retornar a su estado basal, el exceso de energía se libera en forma de luz pero de una longitud de onda mayor (**menor energía**) a la de excitación. Este proceso es representado por el diagrama de Perrin-Jablonski (Figura 2). Un fluoróforo absorbe energía electromagnética pasando de un estado electrónico "basal" (S_0) a un estado electrónico "excitado" (S_1) luego de absorber un fotón (es decir, luz) de energía: $E = h \cdot \nu$; donde E es la energía, h es la constante de Planck y ν es la frecuencia de excitación. Esta energía es suministrada por una fuente de luz externa. La absorción de luz produce una transición electrónica en el fluoróforo: un electrón es promovido desde el orbital molecular ocupado más externo al orbital molecular desocupado más cercano al mismo (Figura 2). Este proceso está dirigido por distintas reglas de selección y la probabilidad de que la transición se produzca esta reflejada por el coeficiente de absorptividad molar, ϵ ($M^{-1} \cdot cm^{-1}$) que está determinado por la ley de Lambert y Beer para cada longitud de onda: $A = \epsilon \cdot l \cdot c$, donde A es la absorbancia, l es el paso óptico y c la concentración del fluoróforo.

En fosforescencia el electrón excitado sufre una transición a un estado más estable (T_1), y la emisión con energía $h\nu_{em}$ resulta mantenida por un tiempo prolongado. En fluorescencia el estado excitado dura un tiempo finito, normalmente entre 10^{-9} a 10^{-8} segundos. En este tiempo el fluoróforo sufre cambios conformacionales y está sujeto a múltiples interacciones con el medio ambiente molecular. Estos procesos tienen dos consecuencias importantes (Figura 1): 1) debido a la energía que se disipa durante el tiempo de vida del estado excitado, el fotón de energía emitido $h\nu_{em}$, es de menor energía que el fotón que el fluoróforo absorbió

previamente, por lo tanto la longitud de onda de emisión es mayor que la de excitación; 2) no todas las moléculas que se excitaron inicialmente por absorción retornan al estado basal de energía por emisión de fluorescencia. Otros procesos como por ejemplo: “quenching” colisional, transferencia de energía de fluorescencia por resonancia (RET), conversión interna o desactivación no radiativa y formación de un fotoproducto pueden disminuir la cantidad de moléculas en el estado excitado y por lo tanto disminuyen el rendimiento cuántico de fluorescencia (Figura 2). El rendimiento cuántico de fluorescencia, ΦF es la razón entre la cantidad de fotones emitidos y la cantidad de fotones absorbidos por una molécula: $\Phi F = \text{cantidad de fotones emitidos} / \text{cantidad total de fotones absorbidos}$.

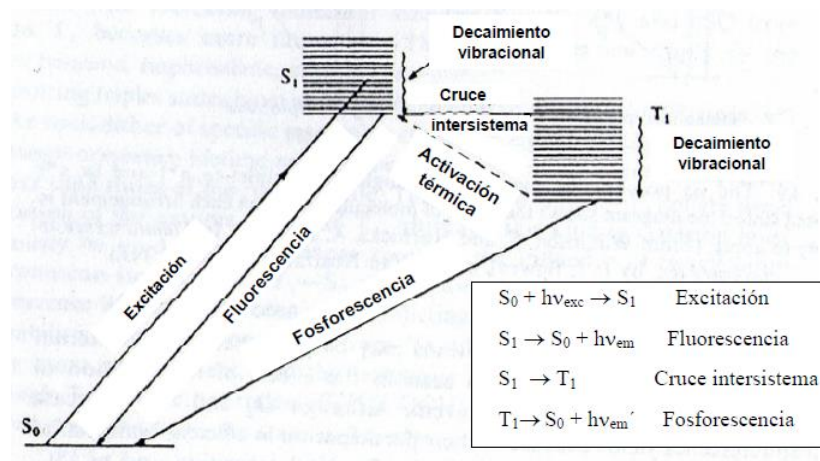


Figura 2. Diagrama de Perrin-Jablonski

Análisis estructural de las proteínas

Hay solo tres aminoácidos aromáticos que absorben luz en la región del ultravioleta cercano ($\lambda > 240 \text{ nm}$) y son: fenilalanina (Phe), tirosina (Tyr) y triptófano (Trp). El espectro de emisión de fluorescencia de las proteínas está determinado por la presencia en la cadena proteica de dichos aminoácidos. Además existen cofactores como FMN, FAD, NAD y porfirinas que también presentan fluorescencia cuando están presentes en las proteínas. Los cambios de la fluorescencia intrínseca pueden

ser usados para monitorear cambios estructurales en la proteína. Los tres aminoácidos aromáticos tienen distinta absorción y emisión de fluorescencia, como se resume en el cuadro 1.

Cuadro 1. Características de fluorescencia de los aminoácidos aromáticos

	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)	Φ_F
Trp	295	353	0,20
Tyr	275	304	0,14
Phe	260	282	0,02

La fluorescencia de una proteína es una sumatoria de las fluorescencias de los distintos residuos aromáticos que posee, pero generalmente se estudia entre 280-295 nm siguiendo la fluorescencia del triptófano. Generalmente, se mide la emisión de fluorescencia del triptófano por su mayor rendimiento cuántico y su vida media más prolongada. Además, la proximidad de estos tres aminoácidos en la estructura de una proteína permite que ocurra transferencia de energía por resonancia (RET) entre Phe y Tyr y entre Tyr y Trp, siendo la fluorescencia del Trp la única que no se transfiere. Las proteínas usualmente tienen un número limitado de Trp y este generalmente se localiza en el sitio activo de las proteínas.

La tirosina (al igual que el triptófano) tiene una fuerte banda de absorción a 280 nm, pero es un emisor más débil que el triptófano, que puede contribuir significativamente a la fluorescencia de una proteína, ya que normalmente está presente en un número mayor y también puede ser fácilmente transferida si se encuentra cerca del triptófano. La fenilalanina conformada por un anillo bencénico y un grupo metileno es débilmente fluorescente. La sensibilidad experimental (el producto de rendimiento cuántico y absortividad molar) es especialmente baja para este residuo. La fluorescencia de la fenilalanina se observa solo en ausencia de tirosina y triptófano.

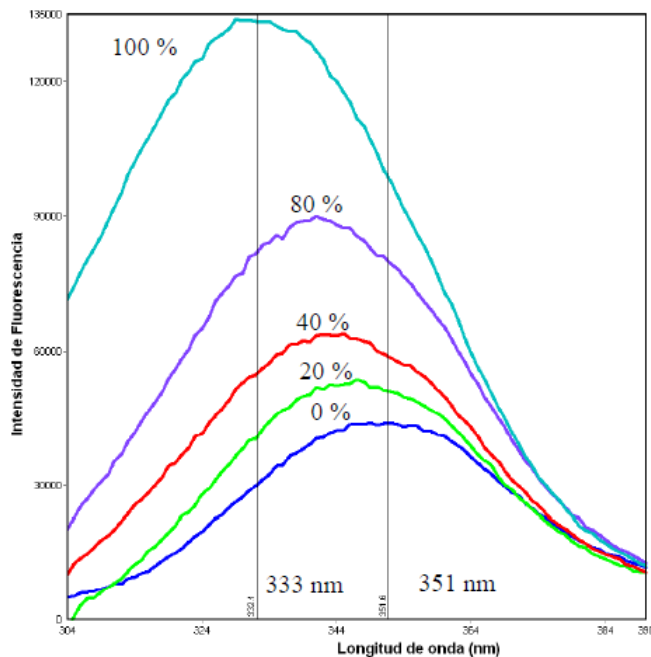


Figura 3. Efecto del solvente en la fluorescencia del triptófano de la MccJ25-Trp.

Los espectros de fluorescencia y el rendimiento cuántico son generalmente más dependientes del medio ambiente que los espectros de absorción y los coeficientes de extinción molar. En las proteínas los residuos de Trp se encuentran generalmente formando parte del núcleo hidrofóbico, por lo tanto en estas zonas las moléculas de agua tienen poco acceso y entonces el espectro de emisión corre hacia el ultravioleta (corrimiento hacia el azul) con un máximo de emisión generalmente en 330 nm; esto se debe a que la energía emitida es mayor que cuando la cadena lateral se encuentra en contacto con el solvente, donde parte de la energía absorbida es transferida a las moléculas de agua y por lo tanto la longitud de onda del máximo de emisión es mayor (340-350). Esto también sucede cuando una proteína se desnaturaliza, por ejemplo, cuando al péptido MccJ25-Trp se resuspende en concentraciones crecientes de dioxano, se ve un corrimiento hacia menores longitudes de onda y un aumento de la fluorescencia (Figura 3).

Los rendimientos cuánticos de los tres aminoácidos aromáticos decaen cuando se incorporan a una proteína. En el cuadro 2 se comparan las características de la fluorescencia de los aminoácidos libres e insertos en una proteína. También

contiene datos que muestran la sensibilidad de la fluorescencia de estos residuos a la polaridad de su entorno. La fluorescencia de los residuos aromáticos varía en forma un tanto impredecible entre las diversas proteínas. Si se compara el estado plegado con el desplegado, el rendimiento cuántico puede aumentar o disminuir. La intensidad de fluorescencia no tiene mucho valor en sí misma, pero la magnitud de la intensidad, puede servir como una sonda de perturbación del estado plegado. La longitud de onda de emisión es un mejor indicador del medio ambiente del fluoróforo. Por otro lado la fluorescencia del triptófano es quencheada por yodo, acrilamida, grupos disulfuros, aminos, carboxilos y residuos de histidina cercanos.

Cuadro 2. Fluorescencia de los aminoácidos libres e insertos en una proteína.

	Solvente	Aminoácido)		Proteína	
		λ_{em} (nm)	Φ_F	λ_{em} (nm)	Φ_F
Trp	H ₂ O	340	0,12	333	0,02
	DMSO	340	0,81	333	0,67
Tyr	H ₂ O	303	0,21	---	---
	DMSO	306	0,27	309	0,06
Phe	DMSO	282	0,02	284	0,006

DMSO = dimetil sulfoxido, un solvente orgánico.

2.7 DICROISMO CIRCULAR

Principios básicos

La luz polarizada circularmente se puede producir por la superposición de dos haces de luz que están oscilando perpendicularmente entre sí y propagándose con una diferencia de fase de $\pi/2$ radianes. La magnitud del vector del campo eléctrico del haz de luz resultante es constante, pero gira alrededor de la dirección de propagación. Si el vector forma una hélice dextrógira, se refiere a una luz polarizada circularmente a la derecha; mientras que, si el vector forma una hélice levógira se refiere a una luz polarizada circularmente a la izquierda (Figura 4).

Un observador estacionario que mira hacia la fuente de luz del vector del campo eléctrico de luz polarizada circularmente ve que ésta está girando en sentido

contrario a las manecillas del reloj, con respecto a su progresión en el espacio. Sin embargo, lo más importante es la dependencia del vector del campo con respecto al tiempo. En este caso, el vector de la luz polarizada circularmente a la derecha gira en la dirección de las manecillas del reloj (Figura 5).

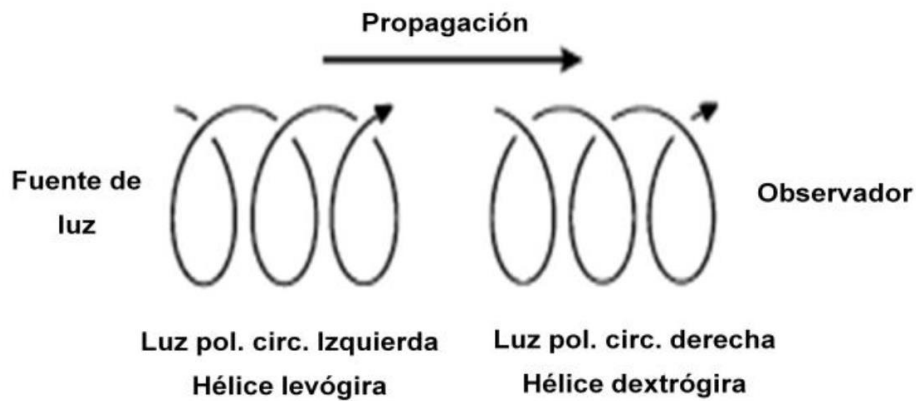


Figura 4. Luz polarizada circularmente, a la izquierda y derecha, propagándose en el espacio.

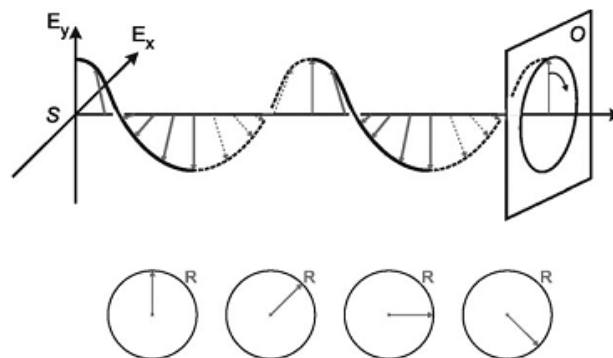


Figura 5. Representación de la luz polarizada desde un punto fijo. Dependencia de la luz polarizada circularmente a la derecha de la distancia desde la fuente de luz, S, (arriba) y del tiempo (abajo) cuando un observador en la posición O está viendo hacia la fuente de luz. La hélice se mueve a lo largo de la dirección de propagación sin girar, causando que el vector de la luz polarizada circularmente hacia la derecha gire en sentido contrario a la dirección de las manecillas del reloj en el espacio, pero en el sentido de las manecillas del reloj en el tiempo.

Las moléculas quirales tienen la ventaja de poseer índices de refracción diferentes para la luz polarizada circularmente dextrógira y levógira, es decir, los haces de luz viajan a diferentes velocidades y son absorbidos en diferentes grados dependiendo de cada energía. Esto significa que los coeficientes de extinción molar para la luz circularmente polarizada dextrógira y levógira son diferentes, $\epsilon_L \neq \epsilon_R$. Este efecto se llama Dicroísmo Circular (DC) y la absorbancia diferencial, $\Delta\epsilon$, entre la luz polarizada circularmente a la derecha y a la izquierda se grafica contra la longitud de onda λ para producir el espectro de DC (Sreerama y Woody, 2004).

$$\Delta\epsilon = \epsilon_L - \epsilon_R$$

Mediciones de Dicroísmo Circular

Los espectropolarímetros miden la diferencia en absorbancia entre los componentes L y R de la luz polarizada circularmente, pero generalmente la reportan en términos de elipticidad (θ) en grados. Cabe señalar que $\theta = (b/a)$ donde b y a son los ejes mayor y menor de la elipse resultante (Figura 6). Existe una relación simple entre $\Delta\epsilon$ y elipticidad (en grados), concretamente $\theta = 32.98 \Delta\epsilon$. El espectro de DC se obtiene cuando el dicroísmo se mide como una función de la longitud de onda.

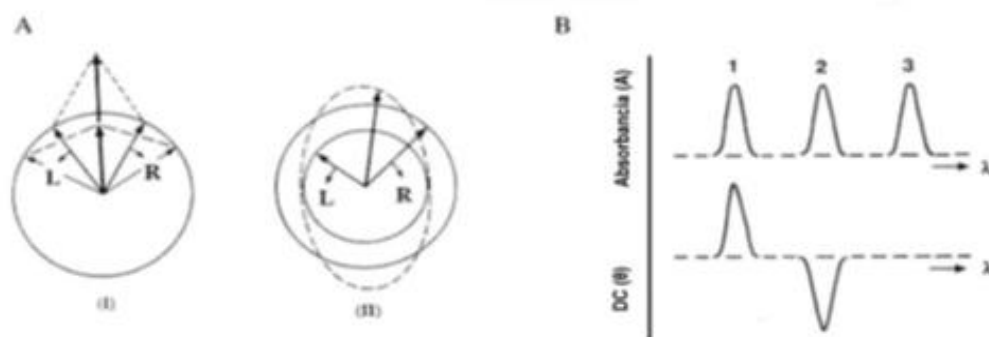


Figura 6. Origen del efecto del Dicroísmo Circular. (A) Los componentes polarizados circularmente a la izquierda (L) y derecha (R) de la radiación polarizada plana: (I) los dos componentes tienen la misma amplitud cuando combinados generan la radiación polarizada plana; (II) los componentes son de amplitud diferente y la resultante es polarizada elípticamente (línea punteada). (B) La relación entre absorbancia y espectro de DC. La banda 1 tiene un espectro de DC positivo con absorbancia L mayor que R; la banda 2 tiene un espectro de DC negativo con absorbancia R mayor que L; la banda 3 corresponde a un cromóforo aquiral.

Aplicaciones del dicroísmo circular

Cualquier cambio conformacional en la estructura de macromoléculas se puede evaluar usando DC. De esta manera, el desdoblamiento de biomoléculas (tales como proteínas, ácidos nucleicos, glucósidos, etc.) se mide como un cambio en el espectro de DC y sirve para dar una medida de la cantidad relativa de cambios que han ocurrido en los componentes. Como para los espectros de absorción, es bien sabido por ejemplo, que las proteínas nativas tienen un espectro de DC característico, con cambios pequeños únicos para cada proteína.

La forma de la curva del espectro, así como los máximos positivos y máximos negativos, proporciona información acerca de la proteína. Así, por ejemplo, picos presentes en el rango 200-250 nm de la longitud de onda (UV-lejano) indican generalmente un espectro con forma "w" con puntos bajos alrededor de 222 y 208 nm siendo indicativo de la presencia de estructuras α -helicoidales, y un espectro con forma "v" con puntos bajos alrededor de 217-220 nm es indicativo de estructuras correspondientes a hojas β . Sin embargo, se han reportado precisiones de 97% para hélices, 75% para hojas β , 50% para giros/vueltas, y 89% para otras estructuras secundarias, respectivamente.

El análisis en el rango del UV-cercano, 250-300 nm, proporciona información acerca de la estructura terciaria. Otras partes del espectro, alrededor de 410 nm pueden proporcionar información estructural para proteínas tipo hemo. La unidad principal definida para el DC es la "elipticidad" que se describe como la tangente de la razón del eje elíptico menor y mayor; en otras palabras, la existencia de elipticidad se conoce como DC. De acuerdo a la literatura, para reportar el DC de una muestra, se utiliza comúnmente la media de elipticidad residual (grados $\text{cm}^2 \text{dmol}^{-1}$) y el dicroísmo circular molar o $\Delta\epsilon$ ($\text{Lmol}^{-1} \text{cm}^{-1}$). Las aplicaciones de espectroscopía de DC pueden clasificarse en varias áreas de estudios biológicos, tales como: evaluaciones conformacionales de proteínas y ácidos nucleicos; termodinámica de plegamiento y desplegamiento de biomoléculas; estudios de interacción de

biomoléculas asimétricas (interacciones proteína-proteína, interacciones DNA-proteína, interacciones proteína-ligando e interacciones DNA-ligando) y cinética de plegamiento y desplegamiento de macromoléculas (Sreerama y Woody, 2004).

Espectro de proteínas en el UV-lejano

El espectro de proteínas en el espectro del UV-lejano depende del contenido de la estructura secundaria y la simple inspección del espectro generalmente revelará información acerca de la clase estructural de la proteína. Los rasgos característicos del espectro de diferentes clases de proteínas se describen a continuación (Venyaminov y Yang, 1996):

-Todas las proteínas tienen una banda intensa negativa con dos picos (a 208 y 222 nm) y una banda muy positiva (en 191–193 nm). Las intensidades de estas dos bandas reflejan el contenido de α -hélices. Los valores de $\Delta\epsilon_{mrw}$ para una proteína completamente helicoidal pueden ser del orden de $-11 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (a 208 y 222 nm) y $+21 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (a 191 y 193 nm).

-Los espectros de proteínas completamente β regulares son significativamente más débiles que los espectros de las proteínas α . Estos espectros comúnmente tienen una banda negativa (a 210-225 nm, $\Delta\epsilon_{mrw}$: -1 a $-3.5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y una banda fuertemente positiva (a 190-220 nm, $\Delta\epsilon_{mrw}$: 2 a $6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

-Los péptidos desordenados y las proteínas desnaturalizadas presentan una banda fuertemente negativa (a 195-200 nm, $\Delta\epsilon_{mrw}$: -4 a $-8 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y una banda mucho más débil (que puede ser positiva o negativa) entre 215 y 230 nm ($\Delta\epsilon_{mrw}$: $+0.5$ a $-2.5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

-Las proteínas $\alpha+\beta$ y α/β casi siempre tienen espectros dominados por el componente α -helicoidal y por tanto con frecuencia muestran bandas a 222, 208, y 190-195 nm. En algunos casos, puede haber un solo espectro ancho mínimo entre 210 y 220 nm debido a las contribuciones superpuestas de α -hélices y hojas β .

Estudios de DC a diferentes temperaturas: control de temperatura

Los estudios de DC a diferentes temperaturas proporcionan información de la estabilidad de las proteínas. Este tipo de experimentos se han podido realizar más fácilmente con la introducción de dispositivos Peltier que permiten que la temperatura dentro de la celda se modifique en una manera más sistemática de lo que es posible con un baño de circulación externa. Sin embargo, existen diversos puntos a tener en cuenta cuando se llevan a cabo estudios térmicos. Estos podrían requerir la realización de controles cuidadosos, por ejemplo:

- 1.- Podría haber un pequeño pero significativo cambio en la longitud de trayectoria de la celda.
- 2.- El solvente se podría evaporar a altas temperaturas, conduciendo a un cambio en la concentración.
- 3.- Podría haber transferencia de calor ineficiente, de modo que la temperatura de la solución de proteína dentro de la celda no refleje el de la fuente externa.
- 4.- Podría haber un efecto de la temperatura en la magnitud de las señales de DC.

Es una buena práctica siempre registrar los espectros de DC con control de temperatura. Esto es particularmente importante para el espectro de proteínas en el UV-lejano, que regularmente muestran una dependencia de temperatura bastante pronunciada, incluso fuera del rango de cualquier desdoblamiento de la proteína inducido térmicamente. Estos pequeños cambios en la señal de la proteína plegada con respecto a la temperatura reflejan un cambio real en la conformación y no son debidos simplemente a cambios en las propiedades ópticas de una hélice o una hebra. Los cambios, que son regularmente lineales con respecto a la temperatura, se deben probablemente a cambios en las interacciones hélice-hélice (Greenfield, 2004).

Una vez ajustados los parámetros descritos arriba, se aconseja realizar una sola medición para verificar que la selección sea apropiada. Los espectros de DC serán

seriamente distorsionados si el voltaje del fotomultiplicador se eleva por arriba de un cierto límite, generalmente del orden de 600 V. El límite menor de longitud de onda seleccionado para espectros en el UV-lejano debe restablecerse al valor más alto si el límite de voltaje del fotomultiplicador se excede. Por otro lado, si el voltaje es tan alto en la región del UV cercano, se debe reducir ya sea la concentración de la muestra o la longitud de trayectoria de la celda. El espectro de las proteínas en el UV cercano normalmente no tiene intensidad significativa en la región de 315-340 nm. Si hubiera señal significativa en esta región (con frecuencia volverse más negativa hacia longitudes de onda menores), podría deberse a que hay contribución de un puente disulfuro en el espectro. El límite de longitud de onda superior para una medición debe ampliarse para permitir la alineación correcta con respecto a la línea basal. La medición completa se debe hacer con las suficientes repeticiones para aumentar la relación S/R hasta niveles aceptables. Si fuera necesario, por ejemplo en titulaciones, se deben hacer las adiciones requeridas a la celda y repetir la medición. Hacer adiciones (especialmente a celdas de longitud de trayectoria corta) tiene varios problemas. El volumen pequeño de la muestra debe mezclarse completamente, ya sea por inversión o usando una punta delgada de pipeta. Esto se tiene que hacer con mucho cuidado para evitar la casi inevitable pérdida de solución que ocurrirá durante esta manipulación. Otro problema encontrado frecuentemente, especialmente con muestras de proteína diluidas, es que el material se pierde debido a que se absorbe en las paredes de la celda o en las puntas de la pipeta.

En la práctica, se puede hacer poco con respecto a esto, pero se aconseja verificar el funcionamiento del equipo realizando una titulación ficticia en la que simplemente se agrega amortiguador a la muestra para comprobar que los cambios en intensidad no se deban únicamente a la dilución. Finalmente, ya que las adiciones pueden aumentar la absorción total, siempre vale la pena estimar (o mejor aún medir) la absorbancia final antes de empezar un experimento en el que se hacen adiciones. El paso final es registrar la intensidad basal usando la misma celda, el mismo amortiguador y los mismos ajustes del instrumento. Estrictamente hablando, el

registro basal debe hacerse usando un amortiguador que contenga algún componente que presente la misma absorción que la muestra pero que no tenga señal de DC (Johnson, 1996b). Sin embargo, esto rara vez se hace y es poco probable que sea un problema importante excepto con señales muy débiles. Se debe reducir el número de mediciones hechas para registrar la señal basal, ya que cualquier ruido en este registro se añade a la medición de la muestra en el subsecuente procesamiento numérico.

Preparación de la muestra

Todas las muestras deben de ser de la más alta pureza posible. Se pueden obtener resultados erróneos incluso cuando existan niveles relativamente bajos de impurezas, si estos tienen señales de DC fuertes. Por ejemplo, señales débiles de proteínas en el UV-cercano pueden saturarse por señales fuertes de niveles relativamente pequeños de ácidos nucleicos contaminantes. Uno de los principales problemas en las medidas de DC es que las señales se distorsionan significativamente si no llega la suficiente luz al fotomultiplicador y, en términos prácticos, esto quiere decir que no se pueden hacer medidas confiables en muestras con una absorbancia (muestra + solvente) mayor a 1. Siempre se debe verificar el espectro de absorción de una muestra para comprobar que no se supere este límite de absorbancia. En el UV-lejano, las mediciones de absorbancia de la muestra por sí misma son generalmente bastante pequeñas, y el principal problema surge de la absorción de los componentes del amortiguador, casi todos los cuales limitarán la penetración del UV-lejano en cierta medida.

La mayoría de los componentes de los amortiguadores generalmente permitirán mediciones de DC por debajo de 200 nm (Johnson, 1996b). Sin embargo, se deben evitar siempre que sea posible, altas concentraciones de cloro y nitrato, ciertos solventes (dioxano, DMSO), altas concentraciones (>25 mM) de algunos amortiguadores biológicos (HEPES, PIPES, MES), altas concentraciones (>0.25 mM) de quelantes comunes (EGTA/EDTA), y altas concentraciones (>1 mM) de agentes reductores (ditiotreitól y 2-mercaptoetanol). También es digno de

mencionar que el agua destilada almacenada en botellas de polietileno, generalmente conducirá a una transparencia pobre en el UV lejano debido a la presencia de polímeros eluidos. Los espectros de DC de proteínas de membrana se registran en su forma solubilizada en detergente para evitar artefactos derivados de la dispersión de la luz diferencial y de la absorción plana (Fasman, 1996). Los espectros de DC de proteínas en el UV-lejano (260-178 nm) son intensos, y se requieren cantidades relativamente pequeñas para registrarlas. Debido a que todos los enlaces peptídicos contribuyen al espectro observado, la cantidad de material (medido en mg/ml) es efectivamente igual para cualquier proteína. Las mediciones se hacen casi invariablemente en celdas de longitud de trayectoria corta para reducir la absorción por los componentes del amortiguador. Normalmente se utilizan 200 μ l de una solución 0.1-0.15 mg/ml cuando se emplea una celda con longitud de trayectoria de 1 mm o 30 μ l de una solución de 1.0-1.5 mg/ml cuando se utiliza una celda de 0.1 mm (desmontable).

Esta última es preferible para una buena penetración en el UV-lejano, pero el material generalmente no se recupera. Los espectros de DC en el UV-cercano de las proteínas son, generalmente, de un orden de magnitud más débil que los espectros de DC en el UV lejano. Registrarlos por tanto requiere muestras más concentradas y/o longitudes de trayectoria más largas. Los espectros se registran comúnmente bajo condiciones similares a aquellas utilizadas para medir un espectro de absorción convencional, por ejemplo, utilizar una celda de longitud de trayectoria de 10 mm y pretender un pico de absorbancia en el rango de 0.7-1.0 (la absorbancia óptima para la mejor relación señal: ruido en una medición de DC, es de hecho 0.869 de acuerdo a Johnson, 1996b). Se pueden utilizar soluciones menos concentradas si las señales de DC son intensas y las muestras más concentradas, pueden de hecho, ser evaluadas utilizando celdas de longitud de trayectoria corta, cuando sea necesario. Los espectros de DC de ácidos nucleicos en el UV-cercano, los cuales son significativamente más fuertes que los de las proteínas, se deben registrar con un pico de absorción en el rango de 0.7-1.0.

Procesamiento de datos

El primer paso es restar la medición de la línea basal de la medición de la muestra. Todos los espectros deben colectarse con una longitud de onda de partida (260 nm para el espectro del UV-lejano; 340 para el espectro del UV-cercano) de por lo menos 15-20 nm al inicio de la medición, donde no debería haber señal. Después de la resta de la línea basal esta región debería, y generalmente es, plana, sin embargo esta señal nunca es cero. El desplazamiento vertical lento de la señal en espectrofluorómetros de DC es la causa común de este problema. La solución es hacer un promedio de la señal aparente de los primeros 15-20 nm del espectro y restarle este valor de la curva total.

El espectro se debe convertir a las unidades deseadas. En el caso de las proteínas, la señal de DC observada, S en miligrados ($1 \text{ miligrado} = 32.98 \times \Delta A$), se convierte al coeficiente de extinción molar de DC ($\Delta \epsilon M$) o la media del coeficiente de extinción molar residual ($\Delta \epsilon MRW$) usando: $\Delta \epsilon M = S/32.980 \times CM \times L$ o $\Delta \epsilon MRW = S \times MRW/32.980 \times C_{mg/ml} \times L$ (unidades: $M^{-1}cm^{-1}$) donde L es la longitud de trayectoria (en cm), CM es la concentración molar, $C_{mg/ml}$ es la concentración en mg/ml, y MRW es el peso medio de los residuos (peso molecular dividido entre el número de residuos). A pesar de que las proteínas globulares grandes generalmente tienen un peso medio de residuos de aproximadamente 111, el valor real siempre debe calcularse para evitar grandes errores potenciales en el cálculo de las intensidades. El cálculo de las intensidades en el UV-lejano se realiza casi siempre con base a los residuos para facilitar la comparación entre proteínas y péptidos con pesos moleculares diferentes. Las intensidades en el UV-cercano deben reportarse generalmente en molar en lugar de en base a los residuos ya que sólo cuatro aminoácidos de la cadena lateral contribuyen a la señal de DC en esta región. En el caso de ácidos nucleicos, las intensidades de DC pueden calcularse usando la base, pares de bases, o concentraciones molares (Martin y Schilstra, 2008).

Las intensidades de DC también se reportan como elipticidad molar (θM) o elipticidad media de residuos (θ_{mrw}), que puede calcularse directamente como:

$$\theta M = S / 10 \times CM \times L \text{ o}$$

$$\theta_{mrw} = S \times MRW / 10 \times C_{mg/ml} \times L \text{ (unidades: grados} \times \text{cm}^2\text{dmol}^{-1}\text{)}.$$

Los valores θ y $\Delta\epsilon$ se interconvierten usando la relación $\theta = 3298\Delta\epsilon$.

2.8 GLOBULINAS 11S

Las semillas han sido la principal fuente de origen vegetal para la alimentación humana de manera directa o indirectamente, debido a su menor costo, la facilidad de almacenamiento y distribución con respecto a otros alimentos. Estas son una fuente de nutrientes que proveen almidones, proteínas, fibra, otros azúcares, lípidos y minerales.

Las proteínas de reserva se han clasificado de acuerdo al método de fraccionamiento de Osborn en: albuminas, globulinas, glutelinas y prolaminas. En los cereales el mayor porcentaje se encuentran entre las albuminas y globulinas. Dentro de las globulinas las denominadas 11S y 7S representan la mayoría de las proteínas de reserva en muchas semillas (Oliveira y col., 2002). Las globulinas 11S tienen un gran potencial por sus propiedades funcionales (Wu y Muir 2008); por ejemplo la glicinina de soya tiene buenas propiedades emulsificantes y de solubilidad, característica que está relacionada con la longitud y la carga negativa de la región variable IV (Tandang y col., 2005). Las globulinas de amaranto tienen una capacidad emulsificante dos veces mayor que los aislados de soya aunque menor que la caseína (Konishi y Yoshimoto, 1989).

Las globulinas 11S han sido objeto de múltiples estudios encaminados a la modificación de su valor nutrimental y funcional, inicialmente se modificó la glicinina de soya en sus regiones variables, con la inserción de codones de metionina para mejorar su valor nutrimental (Kim y col., 1990; Katsube y col., 1994), posteriormente otros estudios realizaron la inserción del péptido bioactivo RPLKPW en las regiones

variables de la subunidad alfa de la Beta-conglicinina de soya (Matoba y col., 2001; Yamada y col. 2009) y la glutelina de soya (Yang y col., 2006).

2.9 AMARANTINA

La globulina 11S de amaranto (denominada amarantina) representa cerca del 18.6% de la proteína total del grano y aproximadamente el 90% del total de las globulinas (Romero-Zepeda y Paredes-Lopez, 1996). Esta proteína ha sido objeto de estudio debido a que tiene excelentes propiedades nutricionales (Barba de la Rosa y col., 1992), emulsificantes y su estabilidad a altas temperaturas, lo cual la hace una excelente candidata como un emulsificante alimenticio de alto valor nutritivo (Konishi y Yoshimoto, 1989).

La amarantina es una proteína de aproximadamente 52 kD conformada por un polipéptido ácido (34–36 kDa) y un polipéptido básico (22–24 kDa) unidos por un puente disulfuro; la amarantina tiende a formar un homohexámero con un peso molecular aparente de 300–400 kDa (Sanfeng y Paredes-López, 1997; Romero-Zepeda y Paredes-López, 1996; Barba de la Rosa y col., 1992).

La secuencia nucleotídica completa del cDNA de la amarantina presenta un marco de lectura abierto de 1470 pares de bases (pb) que codifican para un polipéptido de 490 residuos, de los cuales los primeros 23 del extremo amino son aminoácidos hidrofóbicos y funcionan como péptido señal para su transporte hacia el retículo endoplásmico. Además tiene cuatro residuos de cisteína que son altamente conservados entre las globulinas 11S, la Cys 36 y Cys 69 están involucrados en enlaces intracadena, mientras que Cys 112 y Cys 295 forman el enlace intercadena, entre la subunidad ácida y básica (Barba de la Rosa y col., 1996).

La amarantina se expresó en el sistema heterólogo de *E. coli* obteniendo un rendimiento de 25 a 35 mg de proteína/L (Osuna-Castro y col., 2000), en el caso de la proamarantina se obtuvo un rendimiento de 76 mg de proteína/L y 48 mg/L de proteína con una etiqueta de histidina, purificada por cromatografía de afinidad (Medina-Godoy 2004). La expresión de la preamarantina es recalcitrante en *Pichia*

pastoris, por lo que se le fusionó a la proteína la secuencia KDEL, que es una señal peptídica de retención en el retículo endoplásmico, obteniéndose buenos niveles de expresión (Medina-Godoy y col., 2006).

Se ha expresado en forma estable en plantas de maíz y tabaco (Rascón-Cruz y col., 2004; Valdez-Ortíz y col., 2005) y estudios de alergenicidad del maíz transgénico en ratas no reportaron alguna respuesta adversa (Sinagawa-García y col., 2004). Las características mencionadas, hacen a la amarantina una proteína modelo para su incorporación en diferentes cultivos de interés agronómico, ya que es una proteína alimentaria con un buen balance de aminoácidos.

Modificación de la subunidad ácida de la amarantina

Los primeros trabajos para la modificación de las regiones variables de la amarantina, se realizaron con su subunidad ácida, la cual alberga cuatro de las cinco regiones variables de las globulinas 11S con posibilidades de ser modificadas sin afectar el correcto plegamiento.

Con la finalidad de conocer la estabilidad de la amarantina modificada en alguna de sus regiones variables, se marcó la subunidad ácida con una etiqueta de histidina, se expresó en *E. coli* y se purificó por cromatografía de afinidad obteniendo un rendimiento de 30 mg de proteína/L, similar al que se obtuvo con la amarantina completa, esto sugiere que la subunidad ácida es tan estable como la amarantina completa (Luna-Suárez y col., 2008). Posteriormente, la subunidad ácida fue modificada en su región variable III, insertándole la secuencia de aminoácidos VY cuatro repetidos en tándem y se expresó en *E. coli* Origami DE3, obteniendo un rendimiento de 23 mg/L; el hidrolizado de esta proteína modificada presentó una actividad inhibitoria de ECA con un IC50 de 0.064 mg/ml (Luna-Suárez y col., 2010). Esta misma proteína fue expresada en callos de tabaco agregándole una etiqueta KDEL para retener la proteína en el retículo endoplásmico y se pudo extraer 5 ug/ml de proteína modificada (Santos-Ballardo, 2013).

A la subunidad ácida modificada en la región III, también se le modificó la región IV con la inserción de los péptidos RIPP en su extremo carboxilo, esta se expresó en *E. coli* origami DE3, obteniendo un rendimiento de 9.3 mg/L (Castro-Martínez 2012). A nivel bioreactor se aumentó el rendimiento hasta en 747 mg/L (Arano-Varela, 2012).

Modificación de la amarantina completa

El primer trabajo reportado, fue la modificación de la región variable cinco, agregando cuatro metioninas en el extremo carboxilo terminal, antes del codón de paro y se expresó en *E. coli* Rosetta-gami. En comparación con la amarantina nativa y la recombinante sin modificar, la amarantina modificada al aumentar su superficie hidrófoba redujo su solubilidad, y su capacidad de gelación se vio reducida con respecto a la amarantina recombinante pero superior a la proteína nativa (Carrasco-Peña y col., 2013).

De manera general, las proteínas modificadas con la inserción de péptidos bioactivos se expresaron en menor grado que la proteína sin modificar, sugiriendo que son menos estables, aunque mostraron tener una buena capacidad inhibitoria sobre ECA. Hasta ahora no se ha estudiado el efecto de la inserción de los péptidos en las regiones variables de la amarantina y su subunidad ácida, por lo que resulta interesante determinar sus niveles de expresión y estabilidad de las proteínas, ya que al obtener una proteína modificada que conserve sus patrones de plegamiento y estabilidad permitirá desarrollar cultivos que expresen proteínas modificadas sin ser degradadas por proteasas de vacuola, o producir concentrados proteicos de diferentes fuentes para uso como emulsificantes a nivel industrial.

3. JUSTIFICACIÓN

En este trabajo se propone modificar la estructura de la globulina mayoritaria del amaranto, insertando péptidos bioactivos en cada una de sus regiones variables. Así mismo, determinar cuál es el efecto de la inserción de los péptidos en la expresión y la estabilidad de la proteína. Es necesario conocer qué región o regiones se pueden modificar en la globulina 11S de amaranto sin que se pierda la estabilidad de la molécula, para crear proteínas que puedan ser posteriormente incorporadas en cultivos de interés agronómico con propiedades nutricionales, funcionales o nutracéuticas mejoradas.

4. HIPÓTESIS

Es posible modificar la estructura de la globulina 11S de amaranto insertando péptidos bioactivos en cada una de las regiones variables de la proteína, las regiones que posiblemente tengan más tolerancia a la inserción de los péptidos será la regiones V que se encuentra en el extremo carboxilo terminal, fuera de los dominios cupinas conservados.

5. OBJETIVO GENERAL

Insertar péptidos bioactivos VY en cada una de las regiones variables de la globulina 11S de amaranto y determinar el efecto de cada una de las mutaciones sobre la expresión y estabilidad de las mismas.

6. OBJETIVOS PARTICULARES

- Insertar el péptido VYVYVYVY en las regiones variables I a V de la globulina 11S del amaranto.
- Expresar cada una de las versiones modificadas de la amarantina en *E. coli*.
- Purificar cada una de las proteínas modificadas de la amarantina, mayormente expresadas en *E. coli*.
- Determinar el efecto de la inserción de los péptidos en cada proteína modificada sobre la estabilidad.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

Para la realización de este proyecto se siguió la siguiente estrategia experimental (Figura 7). A continuación se describen las técnicas empleadas en este trabajo de investigación.

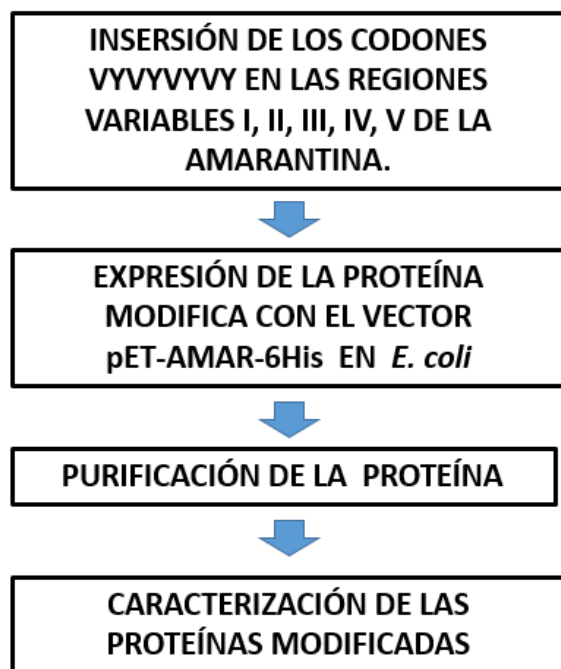


Figura 7. Estrategia experimental.

7.1. FORMULACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO.

Se formularon y evaluaron siete medios de cultivo elaborados con infusión de papa (Cuadro 3). La infusión de papa se preparó con 200 g de papas en 800 ml de agua destilada y se mantuvo en ebullición durante 15 minutos, después se filtró. Esta infusión se utilizó para mezclar con otros componentes que incluyeron extracto de levadura, glicerol y sales de fosfatos, dichos medios formulados fueron esterilizados (los fosfatos por separado). El medio LB (Sigma-Aldrich) que se usa comúnmente para la expresión de proteínas se empleó como medio de control. Una vez obtenido el medio adecuado para la producción de proteínas recombinantes (FPW) se optimizó el uso de extracto de levadura a diferentes concentraciones 0, 5, 8 y 12 g/L, del cual se obtuvo el medio F8PW.

Cuadro 3. Componentes de los medios de cultivos formulados a base de infusión de papa.

Medio de cultivo	Extracto de levadura (g/L)	Glicerol (g/L)	KH ₂ PO ₄ (mM)	K ₂ HPO ₄ (mM)
APW	-	-	-	-
BPW	12	-	-	-
CPW	-	4	-	-
DPW	-	-	17	72
EPW	12	4	-	-
FPW	12	-	17	72
GPW	-	4	17	72
F8PW	8	-	17	72

7.2 CONSTRUCCIÓN DE PLÁSMIDOS

Los plásmidos para la expresión de las proteína modificadas se construyeron a partir del plásmido pET-AMAR-6H (Medina-Godoy y col., 2004), que contiene el cDNA de A11Sg (número de acceso de GenBank: X82121.1)(Barba de la Rosa y col., 1996). Se utilizó como plantilla de PCR para lograr la mutagénesis dirigida al sitio mediante la inserción de cuatro biopéptidos VY en tándem en cada una de las cinco regiones variables (RV). Se usó Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity (Thermo Fisher Scientific) para obtener los productos de PCR.

Los oligonucleótidos para realizar las construcciones se muestran en la Cuadro 4. El producto de la PCR se recircularizó con ADN ligasa T4 (Thermo Fisher Scientific) y luego se transformaron las células TOP10 de *E. coli* one shot™ (Thermo Fisher Scientific) mediante choque térmico (Sambrook, 1989).

7.3. EXPRESIÓN DE PROTEÍNA MODIFICADA.

Las células que albergan el plásmido recombinante se seleccionaron en placas LB que contenían 100 µg mL⁻¹ de ampicilina. Los clones positivos se confirmaron mediante PCR, análisis de restricción y secuenciación del ADN utilizando cebadores de secuenciación T7. Los nuevos plásmidos (Cuadro 4) se extrajeron por el método de lisis alcalina (Sambrook 1989), y luego se transformó en *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3) -RIL (Agilent Technologies) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las células fueron seleccionadas en placas LB que contenían 100 µg mL⁻¹ de ampicilina.

Cuadro 4. Oligonucleótidos correspondientes para la construcción de cada versión las proteínas modificadas y para la detección del inserto.

Construcción	nombre del vector	Oligonucleótidos
R1	pET-AMAR-R1-6His	Dir G Rev CCTTCCTTCACCTTCCATTA
R2	pET-AMAR-R2-6His	Dir GTTTACGTTTACGTTTACGTATACGGCGATCGCTTCCAAGACC Rev TCGCATTCCGAACCTTCCCTG
R3	pET-AMAR-R3-6His	Dir GTTTACGTTTACGTTTACGTATACGAATCTAGACGAGGCGAACGC Rev CCTGCTGAATTGGTGCTCTCCG
R4	pET-AMAR-R4-6His	Dir GTTTACGTTTACGTTTACGTATACTACCTTCCCAATGGTGTGGAG Rev CCTTGAACCCCTGCTACCT
R5	pET-AMAR-R5-6His	Dir CACCACCACCACCACCTG CTCGAGGTATACGTAAACGTAAACGTAAACGCGGGCAATGCTGATTTT Rev CC
VVVVVVY		Dir GTTTACGTTTACGTTTACGTATAC Rev GTATACGTAAACGTAAACGTAAAC

La expresión de la proteína se llevó a cabo en células de *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3) -RIL que albergan los nuevos plásmidos. Con cada colonia seleccionada correspondiente a cada construcción, se hizo un pre-inóculo, creciéndola en 5ml de medio LB a 37°C 150 rpm 12 h. Después a 48 ml de medio FPW en un matraz Erlenmeyer de 250 ml, se inocularon el 2,5% (v / v) del pre-cultivo y se incubaron a 200 rpm a 30 ° C. Cuando OD₆₀₀ alcanzó 0,3-0,4, se indujo la expresión de la proteína mediante la adición de un 0,3% de lactosa, y se continuó el crecimiento. A continuación, se tomaron muestras de 1 ml de cada cultivo formulado a 0, 1.5, 3, 6 y 24 horas y se recogieron mediante centrifugación a 10.000 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Los sobrenadantes se descartaron y los sedimentos celulares se almacenaron a -20 ° C para su posterior procesamiento. Todos los experimentos de expresión de proteínas se realizaron por triplicado. Los resultados se sometieron a ANOVA seguido de la prueba de Fisher para evaluar las diferencias entre los tratamientos.

Para obtener una mayor cantidad de proteína recombinante, el volumen de fermentación se incrementó a 400 ml de medio FPW en un minireactor Nalgen usando las mismas condiciones mencionadas anteriormente. Para la expresión en un reactor de 4 litros de la proteína R2 se utilizó el medio de cultivo F8PW usando 2.5% de inóculo, y se creció a una temperatura de 30°C con agitación a 350 rpm y se indujo a una D.O. de 0.5 con lactosa al 0.5%. En ambos tipos de reactores, se tomó 1 ml de muestra cada hora de 0 a 6 h después de la inducción para el análisis de proteínas. La fermentación se detuvo a las 6 h, y el cultivo se recogió mediante centrifugación a 9.000 x g durante 15 min a 15 ° C. El sobrenadante se descartó y el sedimento celular se almacenó a -20 ° C para su posterior procesamiento.

7.4. SOLUBILIZACIÓN DE PROTEÍNA MODIFICADA INSOLUBLE.

Para disolver los cuerpos de inclusión de la proteína expresada, primero se resuspendieron 0.8 g de biomasa en 7 ml de buffer de extracción (BE) (NaCl 0.2 M, fosfatos 20 mM, pH 7,5). Después se sonicaron las muestras en un homogeneizador ultrasónico Omni Sonic Ruptor 400 (OMNI International). Se realizaron cinco ciclos de sonicación durante 1 minuto a una amplitud del 60% y 1 min de descanso, mientras se mantenía la muestra en hielo y luego se separaron por centrifugación a 9,000 x g durante 30 minutos a 4 °C. El sobrenadante (fracción soluble) se desechó y el sedimento se disolvió en 3,5 ml de buffer de solubilización (BS) (NaCl 0,2 M, fosfatos 20 mM, urea 6 M, pH 7,5) por agitación durante 4 horas a 12 °C a 200 rpm. Luego se separó por centrifugación a 9,000 x g durante 30 minutos a 4 °C. Los sobrenadantes que contenían los cuerpos de inclusión disueltos se almacenaron a 4°C. Las muestras fueron analizadas por SDS-PAGE. La concentración de proteínas se determinó mediante el método del ácido bicinconínico utilizando el ensayo de proteínas Pierce BCA (Thermo Fisher Scientific) y BSA (Sigma-Aldrich) como estándar de proteínas.

7.5 PURIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS MODIFICADAS

La proteína AMR5 se purificó por cromatografía de afinidad utilizando una columna AP-2 de 20x300 mm (Waters) rellena con resina Protino Ni-TED (Macherey-Nagel) acoplada a un sistema de cromatografía BioLogic DuoFlow™ (Bio-Rad). Donde el sobrenadante que contenía la proteína de interés procedente de cuerpos de inclusión se cargó en la columna que se había equilibrado previamente con SB. La fracción que no se unió a la resina se lavó con 110 ml de SB. La proteína unida a la resina se eluyó con SB más imidazol a un flujo de 2.5 ml/min a temperatura ambiente. Se hizo pasar dos volúmenes de columna de buffer de elución a diferentes concentraciones de imidazol (SB más 5, 25, 50, 125, 250 y 500 mM de imidazol) a través de la columna. Todas las fracciones recogidas durante el proceso de purificación se analizaron mediante SDS-PAGE al 10% y se almacenaron a 4°C.

7.6. REPLEGAMIENTO *IN VITRO* DE PROTEÍNAS MODIFICADAS.

Las proteínas recombinantes purificadas obtenidas en las fracciones eluidas con imidazol se ajustaron a una concentración de 0.5 mg/mL. Con la cuales se sometieron a un proceso de diálisis con 1 ml de la muestra contra 50 ml de buffer de replegamiento (BR) (urea, 0,2 M NaCl, 20 mM fosfatos, pH 7,5). La concentración de urea en el BR se fue disminuyendo de 3.0 a 1.5 y 0.5 M cada 1.5 h, y dos pasos adicionales se realizaron con BE sin urea. Durante el proceso de diálisis los tubos se mantuvieron en agitación por medio de un rodillo de tubo analógico (Bibby

Scientific) a 4° C. Después de la diálisis, las muestras se mantuvieron a 4 °C y se analizaron inmediatamente.

7.7. ANALISIS ESPECTROMÉTRICO

Los espectros de dicroísmo circular se registraron en un Espectropolarímetro Chirascan (Fotofísica Aplicada), que estaba equipado con un dispositivo Peltier para controlar la temperatura. Los espectros de CD se obtuvieron con 0.2 mg mL⁻¹ de proteína AMR5 a 25 ° C usando una célula de cuarzo con un recorrido de luz de 0.1 cm, rango de longitud de onda de 195-260 nm, ancho de banda de 2.0 nm y resolución digital de 0.5 s por punto. Se registraron cinco espectros y se promediaron para cada condición experimental. Los datos se corrigieron restando la señal del tampón EB, y los resultados obtenidos en milidegrees se convirtieron a la elipticidad media del residuo ($[\theta]_{mrw}$) utilizando la ecuación definida por Martin y Schilstra (1974), $[\theta]_{mrw} = (S * MRW) / (10 * C * L)$, donde S es la señal de CD en milidegrees, MRW es el peso medio del residuo (peso molecular dividido por el número de residuos), C es la concentración en mg mL⁻¹ y L es La longitud de la trayectoria de la célula en cm.

La predicción de la estructura secundaria se realizó utilizando el servidor DICHROWEB (University of London, UK) (Whiltmore y col., 2003). La fluorescencia intrínseca de AMR5 se midió en un espectrofluorómetro PC1 ISS (Champaign, IL-USA) equipado con un dispositivo Peltier y un soporte de células con camisa de agua para el control de la temperatura. La longitud de onda de excitación fue de 295 nm, el rango de la longitud de onda de emisión fue de 310-410 nm y el ancho de la ranura fue de 2 nm. Las muestras de AMR5 a 0,2 mg mL⁻¹ en EB a 25°C se midieron en una celda de cuarzo con una longitud de recorrido de 0,5 cm. La longitud de onda de emisión máxima (λ_{max}) se determinó a partir de los espectros de fluorescencia.

7.8. ANÁLISIS DE ESTABILIDAD TÉRMICA Y QUÍMICA.

Los cambios conformacionales inducidos por la temperatura se registraron simultáneamente a 208 y 222 nm utilizando una velocidad de calentamiento de 1.5°C min⁻¹ en el rango de 20 a 80 ° C. Después de la rampa de calentamiento, la muestra se enfrió a 20 ° C, y se obtuvieron espectros de CD Far-UV para determinar la reversibilidad de los cambios conformacionales. Los cambios en la señal de CD se analizaron al normalizar la curva de transición a la fracción de moléculas desplegadas (fD) utilizando $fD = (y_t - y_f) / (y_u - y_f)$, donde y_t es la señal de CD observada experimentalmente a una temperatura dada, y_f es la señal espectroscópica de la proteína nativa, y y_u es la señal espectroscópica de la proteína desplegada. La constante de equilibrio (K_{eq}) se calculó como $K_{eq} = fD /$

fN. La temperatura del punto de fusión (T_m) se determinó cuando $K_{eq} = 1$. El cambio estimado en la entalpía de despliegue a T_m (ΔH_m) se calculó utilizando la ecuación de van't Hoff, $d(\ln K_{eq}) / d(1/T) = -\Delta H / R$. La T_m y ΔH_m son valores aparentes, ya que la proteína no mostró reversibilidad después del despliegue térmico.

Los cambios de conformación inducidos por sustancias químicas se monitorizaron mediante fluorescencia intrínseca utilizando la proteína AMR5 a 0,2 mg mL⁻¹ (concentración final) y las concentraciones de urea oscilaron entre 0,5 y 7,0 M con intervalos de 0,5 M. Las soluciones de proteína / desnaturalizante se equilibraron previamente durante 1 hora a 25 ° C y luego se obtuvieron los espectros de fluorescencia. El centro de masa espectral (SCM) se calculó utilizando $SCM = \sum \lambda * I\lambda / \sum I\lambda$, donde λ es la longitud de onda de emisión, e $I\lambda$ es la intensidad de fluorescencia a diferentes longitudes de onda. El punto medio de despliegue estimado ($C1 / 2$) se estimó asumiendo un modelo de dos estados. La constante de equilibrio de la reacción (K_{eq}), la energía libre de Gibbs a una concentración cero de desnaturalizante (ΔG_{H_2O}) y la pendiente (m) se calcularon como se informó anteriormente (Greene y col., 1974).

7.9. ACTIVIDAD INHIBITORIA DE LA ECA

Un miligramo por mililitro de proteína AMR5 replegada se digirió con tripsina y quimotripsina ($E / S = 1/200$ (p / p) durante 18 horas a 37 ° C ajustado a pH 8. Después de la digestión enzimática, la muestra se hirvió para detener la Reacción enzimática y centrifugado. Los péptidos obtenidos se usaron para realizar la enzima convertidora de angiotensina (ECA) - ensayo de actividad inhibitoria. Las propiedades de AMR5 antihipertensivo se midieron mediante un ensayo espectrofotométrico (Luna-Suárez y col., 2010). Las muestras se prepararon por triplicado. La actividad inhibitoria se calculó como la concentración de péptido necesaria para inhibir el 50% de la actividad de la ECA original (IC_{50}).

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 DISEÑO DE UN MEDIO DE CULTIVO A BASE DE INFUSIÓN DE PAPA

E. coli ha sido el organismo más utilizado para la producción de proteínas recombinantes, sin embargo, los medios de cultivo para la producción de proteínas recombinantes tienen un costo elevado. En este trabajo se diseñó un medio de cultivo para cubrir los requisitos nutricionales de *E. coli* para producir proteínas recombinantes a un menor costo. Se analizaron siete medios de cultivo, que contenían residuos de papa complementados con uno o más de los siguientes ingredientes: extracto de levadura, fosfatos y glicerol (Cuadro 3). Para evaluar el efecto de cada componente combinado con la infusión de papa se formularon los medios BPW, CPW y DPW, y se usó el APW como control.

Como se puede observar en la figura 8, el medio DPW, es el medio que produjo mayor cantidad de la proteína de interés a las 6 horas mientras que el medio BPW acumuló de forma similar hasta las 24 horas. Sin embargo, en el medio CPW, *E. coli* fue incapaz de producir la proteína recombinante, teniendo un efecto similar al control (APW). La efectividad del medio DPW para producir la proteína recombinante podría estar relacionado tanto con el aporte nutricional del fosfato sobre el metabolismo de *E. coli*, así como por su efecto tampón que evita la acidificación del medio durante la fermentación. Estos dos factores permiten aprovechar la fuente de nitrógeno proveniente de la infusión de papa, y que con la sola infusión de papa *E. coli* no fue capaz de aprovechar esta fuente de nitrógeno. En el caso del medio BPW la proteína recombinante se acumuló gradualmente desde las 6 h hasta las 24 h, incluso más que en el medio DPW. Esto indica que la tasa de degradación de proteínas es baja, y esto podría ser debido a que el extracto de levadura es un sustrato nutritivo que proporciona hidratos de carbono, aminoácidos, péptidos, minerales y vitaminas que contribuyen a la síntesis de proteínas. A diferencia del glicerol el cual no aporta ningún beneficio en la acumulación de la proteína de interés ya que solo es una fuente de carbono (Figura 8a-d).

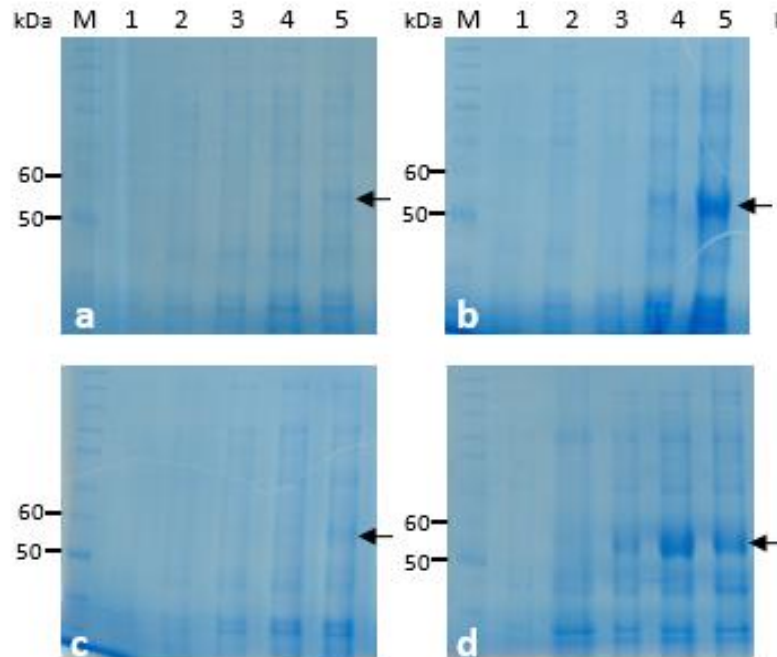


Figura 8. Expresión de una globulina 11S modificada de amaranto expresada en medios de cultivo a base de infusión de papa y otro componente. a: infusión de papa (control); b: extracto de levadura; c: glicerol; d: fosfatos.

Al combinar dos componentes con la infusión de papa, la producción de proteína recombinante incrementó significativamente en todos los medios, detectando la proteína desde la 3 h después de la inducción. La máxima acumulación de proteínas se produjo a las 24 h en todos los medios.

En el medio FPW, *E. coli* produjo la mayor cantidad de proteína recombinante, un 40% más que en el medio LB comercial, mientras que en el medio GPW se expresó a niveles similares que el medio LB, de acuerdo con el análisis densitométrico (Figura 9f,h). En el medio EPW, la expresión de proteína fue muy baja, incluso menor que la de los medios BPW o DPW, que contenía un solo componente (Figura 9e). Esto indica que una combinación de fosfatos y extracto de levadura contribuye tanto al crecimiento del cultivo de la bacteria como a la producción de proteínas recombinantes.

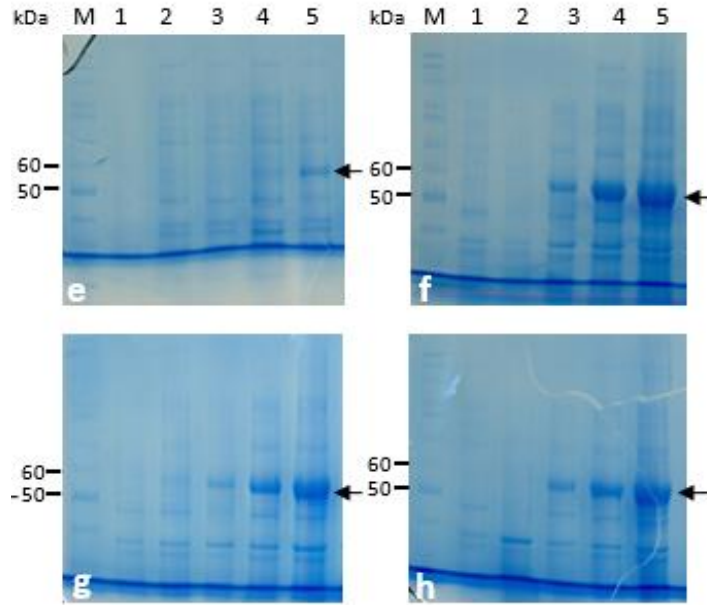


Figura 9. Expresión de una globulina 11S modificada de amaranto expresada en medios de cultivo a base de infusión de papa y otros dos componentes. e: extracto de levadura + glicerol; f: extracto de levadura + fosfatos; g: glicerol + fosfatos; h: medio LB.

El medio FPW fue el mejor medio formulado para obtener una alta producción de proteínas recombinantes. Para optimizar la formulación se probaron diferentes cantidades de extracto de levadura. Los resultados mostraron que 8 g L⁻¹ de extracto de levadura (F8PW) produjeron una cantidad similar de proteína recombinante a 12 g L⁻¹ (Figura 10).

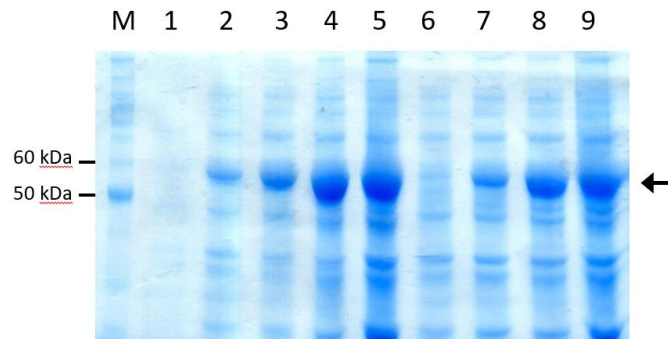


Figura 10. SDS-PAGE de la expresión de AMR5 que produce *E. coli* en medio FPW en cantidades distintas de extracto de levadura. Carril M: marcador de peso molecular de proteínas. Carril 1, no inducible; los carriles 2-5 y 6-9 corresponden a 6 y 24 h después de la inducción respectivamente, usando extracto de levadura a 0 g / L (carriles 2,6), 5 g / L (carriles 3,7), 8 g / L (carriles 4,8) y 12 g / L (5,9). La flecha indica la banda de proteína recombinante.

8.2 CONSTRUCCIÓN DE LAS PROTEÍNAS MODIFICADAS

La proteína A11Sg se clasifica como una globulina 11S y alberga cinco regiones variables (Wright, 1988; Dickinson y col., 1990, Adachi y col., 2001; Adachi y col., 2003). A cada una de las cinco regiones variables se modificaron mediante la inserción de cuatro péptidos VY en tándem (Figura 11a) por mutagénesis sitio-dirigida en el vector de expresión pET-AMAR-6His. El vector de expresión utilizado es el pet32b(+) el cual contienen un sitio de origen de replicación (pBR322), con una secuencia de inicio de la traducción RBS operada por el gen *lac*, este vector confiere resistencia a ampicilina y adiciona una cola de seis histidinas en el extremo carboxilo terminal (Figura 11c). Esta proteína fue diseñada para ser consumida como un alimento funcional de tal manera que los péptidos insertados puedan ser liberados por las enzimas gastrointestinales. Por lo tanto, las cadenas de cuatro VY se insertaron después de una arginina y en el caso de la construcción R5 se adicionó este aminoácido; con la finalidad de que la enzima tripsina libere el tándem VY. Entonces los péptidos VY son liberados por la quimotripsina que corta en el extremo carboxilo de la Tirosina (Figura 11b). La correcta inserción de los péptidos bioactivos se confirmó por PCR y secuenciación de oligonucleótidos.

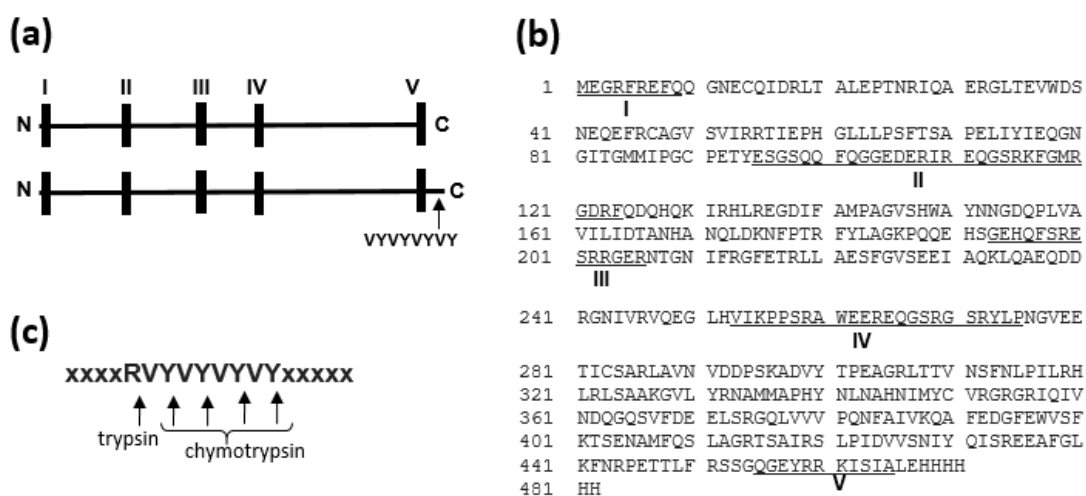


Figura 11. Representación esquemática y secuencia de aminoácidos de la 11S globulina de amaranto. (a) Representación esquemática de la inserción de cuatro péptidos VY en tándem en A11Sg C-terminal. El número romano representa la región variable. (b) Secuencia de aminoácidos

de 11Sg. Las letras subrayadas indican las regiones variables. (c) Sitios de escisión de tripsina y quimotripsina que liberan los péptidos antihipertensivos VY.

8.3 EXPRESION DE LAS PROTEÍNAS MODIFICADAS

Una vez obtenidas las construcciones se utilizaron estos vectores para transformar la cepa de expresión BL21 condon plus RIL de *E. coli*. De las clonas obtenidas se eligieron las más productivas y se expresaron a nivel matraz. Así mismo, la globulina 11S de amaranto (AM) sin modificar, también fue expresada en la misma cepa. Se observó que en todas las proteínas expresadas en *E. coli*, una banda de 56 kDa fue detectada a partir de las 3h después de la inducción, excepto la R1 que se detectó desde la 1.5 h; obteniendo para todas las proteínas modificadas la mayor acumulación a las 6 h. A las 24 tuvieron una disminución de su acumulación; lo cual significa que hay un proceso de proteolítico que afecta la producción de las proteínas recombinantes (Figura 1 apéndice A). En la figura 12 se muestra la expresión de las proteínas recombinantes tomadas a las 6 horas después de la inducción; de acuerdo a el análisis densitométrico se puede observar que la acumulación de las proteínas recombinantes de mayor a menor cantidad fue en siguiente orden AM > R3 > R1 = R4 > R5 > R2. Esto muestra que la proteína nativa sin modificar tiene una mayor acumulación que sus versiones modificadas, lo cual es un indicio del efecto que produce la modificación de las regiones variables. En este caso las inserciones de los péptido VY, se llevaron a cabo en las regiones variables que teóricamente no alteran la estructura intrínseca de esta proteína (Wright, otros). Sin embargo, de acuerdo a estudios que se han realizado con la conglicina de soya la cual está clasificada como una globulina 11S la inserción de péptidos en sus regiones variables cambia el nivel de expresión de la proteína en *E. coli* (Prak y col., 2006; Morales-Camacho y col., 2016; Morales-Camacho y col., 2018). Con estos cambios en los niveles de expresión de las proteínas modificadas podemos observar que la proteína modificada en la región II es la que tiene menor nivel de acumulación, lo cual nos hace inferir que esta región altamente vulnerable, que podría estar cambiando el patrón de replegamiento que adopta la proteína AM en *E. coli*, lo que en consecuencia podría aumentar la tasa de proteólisis.

Con respecto a los rendimientos obtenidos, estos fueron más altos que los reportados por otros autores, incluso para la R2, la cual tuvo niveles de acumulación más altos que los 76 mg/L alcanzados con la proteína A11Sg nativa (Castro-Martínez y col., 2013), 55 mg/L de subunidad ácida de A11Sg nativa (AAC) (Luna-Suárez y col., 2008) y 550 mg L⁻¹ de la subunidad ácida A11Sg modificada en la región III (AACM3) (Luna-Suárez y col., 2010). Para todas las proteínas recombinantes la mejor productividad fue a las 6 h. La mayor producción de estas proteínas recombinantes puede deberse a tres factores: la cepa de expresión, el nuevo medio F8PW y que las proteínas expresadas corresponden a la molécula completa de la globulina 11S de amaranto, es decir se está expresando las dos subunidades (la ácida y la básica), igual a la estructura que se forma dentro del retículo endoplásmico en planta. Para confirmar que la proteína que se visualiza en el gel de acrilamida es la proteína de interés, se realizó el Western *blot* en el cual se pudo observar una banda de 56 kDa (Figura 12).

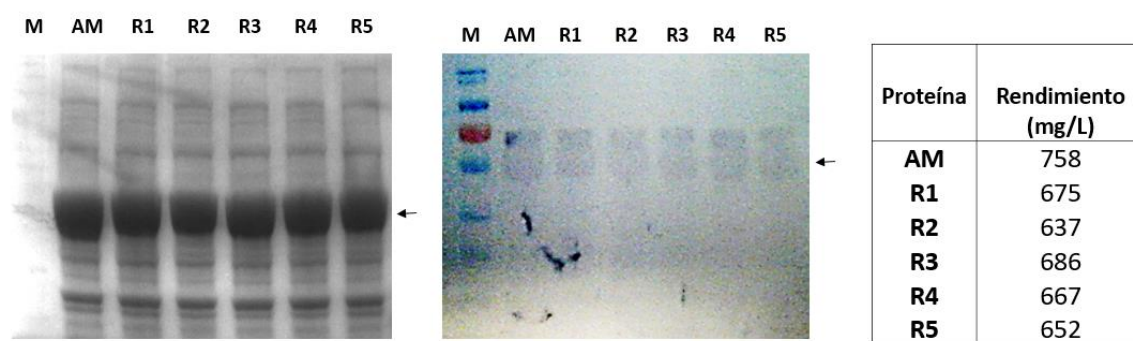


Figura 12. Perfil electroforético SDS-PAGE y Western blot de la globulina 11S de amaranto y sus versiones modificadas expresadas en *E. coli*. Los rendimientos de proteína total fueron estimados en densitométricamente. M: marcador de peso.

Con la finalidad de obtener mayor cantidad de proteína se realizaron las fermentaciones en minireactores NALGEN con un volumen de 400 ml mostrando comportamientos similares en la acumulación de proteínas. Los rendimientos también fueron similares incluso a nivel fermentador de 4 L, en donde la proteína R2 tuvo rendimientos similares en ambos tipos de reactores (Apéndice A). Por lo que, para realizar los siguientes experimentos se utilizaron la biomazas obtenida de

las fermentaciones en el minireactor NALGEN, para la extracción de las proteínas recombinantes.

8.4 PURIFICACIÓN DE LAS PROTEINAS MODIFICADAS

Primero la biomasa celular fue sonicada para romper la pared celular y extraer la proteína recombinante. Después la fracción de proteína total insoluble se separó de la fracción de proteína total soluble. Por medio de SDS-PAGE se observó de todas las versiones modificadas se encontraban en la fracción insoluble, es decir que *E. coli* produjo estas proteínas en cuerpos de inclusión (Apéndice B). Al respecto, la mayoría de los informes coinciden en que las globulinas 11S tienden a formar cuerpos de inclusión o muestran baja solubilidad de la proteína recombinante cuando se expresan en el citoplasma de *E. coli* (Castro-Martínez y col., 2013; Osuna y col., 2000, Prak y col., 2006; Tandang y col., 2013; Carrasco-Peña y col., 2013). En este caso, la expresión insoluble de AM y sus versiones modificadas pueden verse influida tanto por la alta velocidad de traducción, que conduce a un plegamiento incorrecto de la proteína, como por el entorno reductor del citoplasma de *E. coli*, que no forma fácilmente enlaces disulfuro (Farneth y col., 2004; Rosano y col., 2014). Posteriormente, con la fracción de proteína insoluble, se pasó a través de resina de Ni-TED para purificar la proteína mediante cromatografía de afinidad. Después de lavar con soluciones a diferentes concentraciones de imidazol, la mayoría de las proteínas recombinantes se eluyeron con 125 mM de imidazol excepto la R5, la cual se eluyó a 25 mM de imidazol. Esta baja concentración para separar la proteína R5 de la resina podría estar relacionada directamente con la modificación en el extremo carboxilo terminal. Ya que la cadena de 4 pares de aminoácidos Valina-Tirosina en tándem, por su naturaleza hidrofóbica (Cuadro 7) tiende a buscar una región igualmente hidrofóbica de la proteína provocando indirectamente que la cola de histidinas permanezca más cerca de la estructura de la proteína que interactuando con el medio acuoso. Los rendimientos oscilaron alrededor del 6 mg/L, siendo la R1 la que se obtuvo al rendimiento más bajo de 2.4 mg/L (Cuadro 5).

Cuadro 5. Rendimiento de proteínas purificadas.

Proteína	Imidazol (mM)	Rendimiento (mg/L)
AM	125	5.0
R1	125	2.4
R2	125	8.0
R3	125	7.6
R4	125	6.0
R5	25	6.6

8.5 REPLEGAMIENTO *in vitro*.

Una vez obtenidas las fracciones purificadas se realizó un protocolo de replegamiento por el método de diálisis. Durante el proceso de replegamiento se formaron agregados, donde el porcentaje de recuperación varió en las diferentes proteínas recombinantes (Cuadro 6). Los rendimientos de mayor a menor fue en el siguiente orden $R5 > R3 > R4 = R2 > AM = R1$. La proteína R5 tuvo el mayor porcentaje de recuperación (50%) de proteína en estado soluble, seguida de la R3 con un 19%; la R4 y R2 recuperaron alrededor del 10%. Sin embargo, la R1 no fue posible recuperarla ya que después de la diálisis no era posible detectar la proteína de forma cuantificable y en el caso de la AM el porcentaje de recuperación fue muy bajo. En el caso de R5 la modificación en el extremo carboxilo terminal podría estar afectando el patrón de replegamiento, lo cual permite formar mayor cantidad de estructuras solubles en agua. Posiblemente esto se deba a que la inserción del péptido VY en tándem junto con los aminoácidos isoleucina, alanina y leucina forman un bloque de 11 aminoácidos hidrofóbicos (Cuadro 7) que pueden interactuar con otras zonas hidrofóbicas permitiendo formar otros pliegues de forma independiente. Con estas muestras se realizó espectroscopía de fluorescencia y dicroísmo circular

Cuadro 6. Porcentaje de recuperación de proteína replegada.

Proteína	Concentración (mg/ml)		%
	inicial	final	
AM	0.3	0.01	3
R1	0.2	n/d	1
R2	0.2	0.02	10
R3	0.51	0.1	19
R4	0.21	0.025	12
R5	0.56	0.28	50

Cuadro 7. Secuencia de aminoácidos del extremo carboxilo terminal de las proteínas recombinantes AM y R5. S: hidrófilo. I: hidrófobo.

Proteína	Secuencia de aminoácidos en el extremo carboxilo terminal
AM	SNIYQISREEAFGLKFNRPETTLFRSSGQGEYRRKISIALEHHHHHH SSIISSSSSIIIISSISSSSIISSSISISSSISIISSSSSSS
R5	SNIYQISREEAFGLKFNRPETTLFRSSGQGEYRRKISIAVYVYVYVYLE HHHHHH SSIISSSSSIIIISSISSSSIISSSISISSSISIIIIIISSSSSSS

8.6 ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

En la espectroscopia de fluorescencia con la aplicación de energía de excitación de 280 nm, se observó el espectro de emisión singular de una proteína con estructura ordenada, con una mayor energía de emisión entre 329-333 nm para la amarantina y sus diferentes versiones modificadas (Cuadro 8); esto nos indica que la inserción de los de los péptidos antihipertensivos en las diferentes regiones variables de la amarantina condicionan a diferentes estados estructurales de formación independiente. La amarantina sin modificar tiene una energía de emisión de 333 nm, al igual que las proteínas R1, R3 y R4, lo cual nos indica que estas versiones siguen un patrón de replegamiento similar a la proteína sin modificar, la R2 tienen

una energía de emisión menor a las anteriores con 331nm, lo cual hace suponer que la inserción de los aminoácidos antihipertensivos esta interactuando con alguna región hidrofóbica provocando que el triptófano cercano a la inserción sea cubierto dentro de la misma estructura provocando que al ser excitado tenga una mayor energía de emisión. Para la R5 muestra una meseta de emisión entre 325-333 nm, lo cual nos indica que esta proteína tiene diferentes especies de glóbulo fundido y por lo tanto diferentes estados de hidratación de los triptófanos, que no presentan las otras versiones de la amarantina modificada; esto es un factor importante ya que nos indica que el bloque hidrofóbico de 11 aminoácidos que se forma puede interactuar con distintos zonas hidrofóbicas de la amarantina formándose diferentes patrones de replegamiento generando así, diferentes especies (Figura 13).

Cuadro 8. Emisiones de fluorescencia máxima en urea 6M y buffer de fosfatos.

Proteína	Intensidad de fluorescencia	
	Urea 6M	B. fosfatos
AM	319	330
R1	329	332
R2	331	331
R3	331	331
R4	330	331
R5	351	330

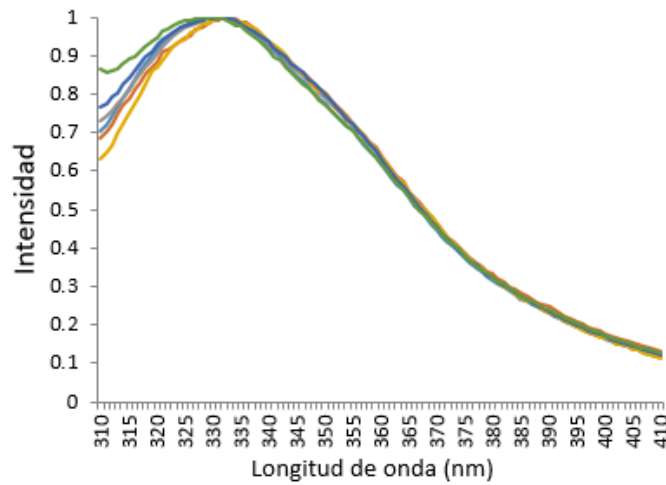


Figura 13. Espectros de fluorescencia de las proteínas recombinantes.

Los resultados de los cálculos del centro espectral de masas se muestran en el cuadro 9, donde se observa que las proteínas presentan valores más altos en su estado desnaturalizado con UREA 6M y se reducen al haber sido replegadas, lo cual nos indica que existe un cambio a nivel estructural después del replegamiento. La R5 presenta una diferencia en su valor mayor con respecto a las otras proteínas lo cual se correlaciona con su espectro de fluorescencia, ya que presentó una señal máxima de 351 y 330 en su estado desnaturalizado y replegado respectivamente; en el caso de las otras proteínas, las emisiones máximas son similares tanto en su estado desnaturalizado como replegado.

Cuadro 9. Centro espectral de masas de las proteínas modificadas.

Proteína	urea 6M	replegada
AM	350.3	345.5
R1	350.8	346.3
R2	351.1	345.6
R3	350.9	346.1
R4	350.5	345.6
R5	358.4	345.3

8.7 ESPECTROSCOÍA DE DICROISMO CIRCULAR

En la espectroscopía de dicroísmo circular podemos observar que tenemos una elipticidad negativa entre 208 y 222 nm, característica de una proteína con estructura $\alpha+\beta$; con una señal mínima en la banda de 208-210 nm en las diferentes versiones de amarantina modificada, excepto en la R3 presentando la mínima en 215 nm; las proteínas AM, R1, R3 y R5 presentan un hombro a 222 nm, que no presentan las otras proteínas modificadas (Figura 14). En el espectro se puede observar que las proteínas AM, R1, R3 y R5 presentan una señal de elipticidad molar alrededor de -7000, saliendo de este rango la R2 y R4 lo cual está asociado a la concentración de la muestra.

Se realizó una predicción de estructura secundaria con el servidor Dicrhoweb usando el algoritmo CDSSTR en el cual la AM, R1, R3 y R5 presentan un porcentaje similar de estructura hélice con alrededor del 21%, sin embargo, en la formación de estructura beta, la AM y R1 resultan con alrededor del 28%, para la R3 y R5 de 24 y 22% respectivamente; estos valores están cercanos al 25% reportado para la amarantina (Tandang, 2013). Con respecto a la R2 y R4 presentan un porcentaje más alto de estructura de hélice con el 38% y un porcentaje más bajo de estructura beta de alrededor del 16% (Cuadro 10).

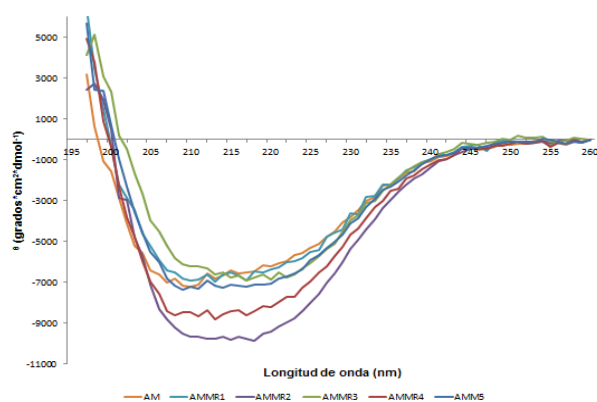


Figura 14. Espectros de dicroísmo circular de las proteínas recombinantes.

Cuadro 10. Predicción de la estructura secundaria de las proteínas recombinantes.

proteína	*Estructura secundaria: hélice (%)	*Estructura secundaria:	*Estructura secundaria: asas y giros (%)
AM	20	28	52
R1	20	29	50
R2	38	17	46
R3	21	24	55
R4	38	16	45
R5	23	22	55
Cristalizada	11	25	64

8.8 DESNATURALIZACION TÉRMICA

En la determinación de la temperatura media de desnaturalización las proteínas R1, R2, R4 no presentaron una curva de desnaturalización, lo cual sugiere que no presentaron estructura secundaria. Las proteínas R3 y R5 presentaron curva de desnaturalización con una T_m de 57.6, 56.1 grados centígrados respectivamente (Figura 15), lo cual indica que estas proteínas forman estructura secundaria. La T_m de estas proteínas se encuentran cercanas, lo cual sugiere que están presentando un patrón de repliegamiento similar.

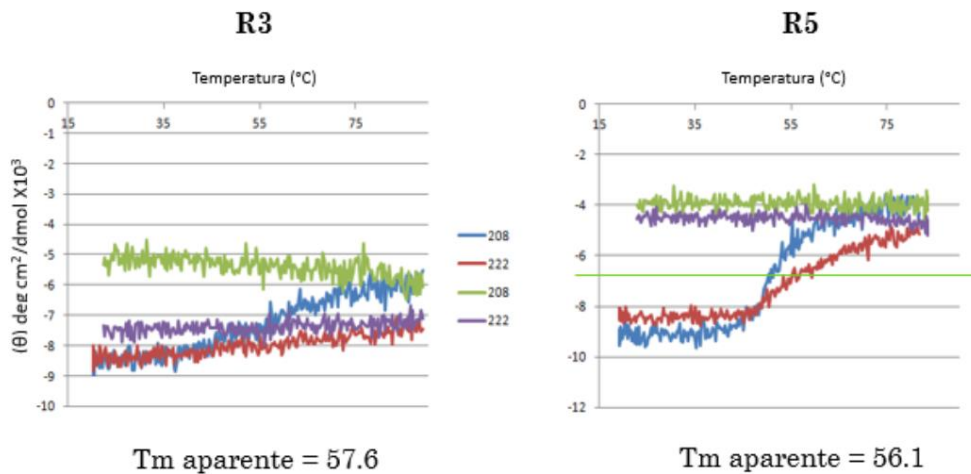


Figura 15. Espectro de dicroísmo circular de R3 y R5 con rampa de temperatura de 20-95°C.

8.9 DESNATURALIZACIÓN QUÍMICA

En la determinación de la concentración media de urea para la desnaturalización de una proteína se determinó de 2.8 M para la R5 (Figura 16), este valor es superior al de 1.7 y 2.52 de la AAC y AACM.1 respectivamente, esto nos muestra que la R5 tiene una mayor estabilidad y resistencia a la desnaturalización, debido a un repliegamiento ordenado, y aunque, es posible que no adopte una estructura terciaria parecida a la amarantina nativa, si es claro que forma una estructura más estable que la subunidad ácida de la amarantina.

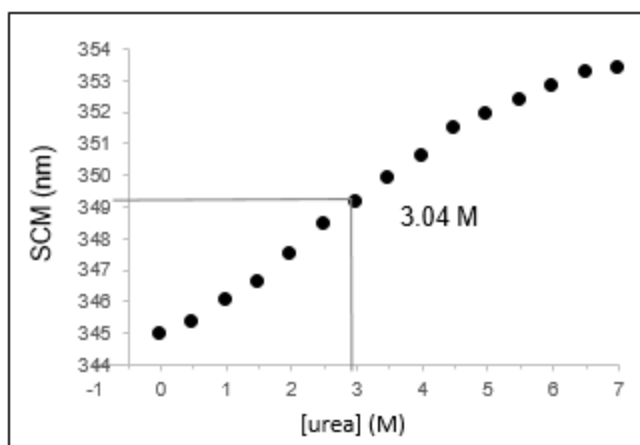


Figura 16. Desnaturalización química seguida por espectroscopía de fluorescencia.

8.10 PUNTO ISOELECTRICO

Debido a que el porcentaje de recuperación de la proteína modificadas fue muy bajo, solo fue posible realizar el electroenfoque con la proteína R5, a la cual se observó que su carga neutra fue de 6.7 (Figura 17), valor que se asemeja al de la amarantina reportado por Godoy y col. (2005) y para AM presenta un PI de 6.0, lo cual sugiere que podría haber una alteración durante la traducción que provoque la incorporación o sustitución de aminoácidos con carga negativa (Asp y Glu), aunque no se descarta los aminoácidos con carga positiva (Arg, His y Lys), para delucidar este fenómeno se recomienda hacer secuenciación de aminoácidos por medio de espectrometría de masas, información que es de suma importancia y que serviría para el diseño de una estrategia para el estudio de este comportamiento a nivel traducción de proteínas.

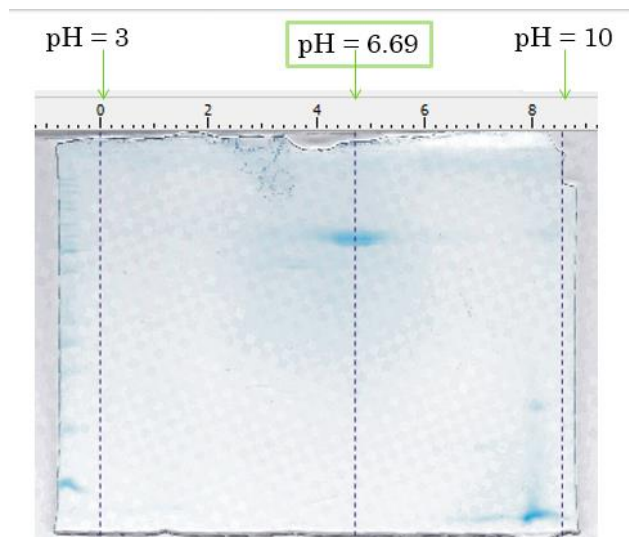


Figura 17. Punto isoeléctrico de la proteína R5.

8.11 ACTIVIDAD ANTIHIPERTENSIVA

Con la muestra replegada de la proteína R5 se realizó el ensayo de inhibición de la enzima convertidora de angiotensina *in vitro*. El valor IC₅₀ de la proteína R5 digerida fue de 0.034 mg/mL, que es 17 veces mejor que el de las globulinas de amaranto digeridas con alcalase (Soriano-Santo y col., 2015), 14 veces mejor que el del A11Sg ácido, y 1.8 veces mejor que el del A11Sg ácido. A11Sg subunidad ácida con cuatro péptidos VY en tándem en la subunidad variable región III (AACM.3) (Luna-Suárez y col., 2010). Es 1.3 veces mejor que la de la subunidad ácida A11Sg modificada en las regiones variables III y IV (AACM3.4) con cuatro péptidos VY en tándem y un IPP respectivamente (Castro-Martínez y col., 2013). En AMR5, el número de péptidos antihipertensivos es el mismo que el de AACM.3 y uno menos que el de AACM.3.4. Sin embargo, el valor IC₅₀ de AMR5 fue mejor. Esto puede deberse a la acción antihipertensiva de los péptidos GR (Matsufuji y col., 1994) y EW (Foltz, 2009) que se administran mediante tripsina y quimotripsina durante la digestión *in vitro* (según una simulación *in silico*). También se informa de que estos péptidos son inhibidores de la ECA. Teniendo en cuenta que los péptidos VY se insertaron en el extremo C-terminal de la cadena polipeptídica, las proteasas pueden tener un fácil acceso al sitio de corte, liberando las unidades peptídicas VY que en consecuencia aumentan el efecto antihipertensivo.

9. CONCLUSIONES

-Se formuló y demostró que el medio cultivo F8PW es excelente para la producción de proteínas recombinantes con un alto nivel de acumulación de proteínas recombinantes.

-Se contruyeron cinco proteínas derivadas de la globulina 11S de amaranto por la inserción de los péptidos VYVYVYVYV en las regiones variables.

-Se expresó en *E. coli* la proteína nativa y sus cinco proteínas modificadas con los péptidos bioactivos.

-La proteína nativa y sus cinco proteínas modificadas con los péptidos bioactivos fueron purificadas.

-Se determinó que las proteínas modificadas mantienen una estructura Beta I como la que presenta la proteína nativa, sin embargo, la modificación de la región II, III, IV y V, modifica el patrón de replegamiento *in vitro* de la proteína nativa.

-Las inserciones en las regiones III y V cambian la estabilidad térmica de la globulina 11S de amaranto.

-La proteína R5 forma una estructura ordena diferente a la proteína nativa que favorece su replegamiento *in vitro*.

-La digestión de la proteína R5 por proteasas digestivas, liberan los péptidos bioactivos VY presentando actividad funcional *in vitro*.

10. LITERATURA CITADA

- Adachi M, Takenaka Y, Gidamis AB. Crystal structure of soybean proglycinin A1aB1b homotrimer. *J Mol Biol* 2001;12:291-305.
- Adachi M, Kanamori J, Masuda T. Crystal structure of soybean 11S globulin A3B4 homohexamer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:7395-7400.
- Arano-Varela H, Domínguez-Domínguez J, Paredes-López O. Effect of environmental conditions on the expression levels of a recombinant 11S amaranth globulin in *Escherichia coli*. *Recent Pat Biotechnol* 2012;6:23-31.
- Barba de la Rosa A. P., Gueguen J., Paredes-López O. y Viroben G. Fractionation procedures, electrophoretic characterization and amino acid composition of amaranth seed protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1992;40:931-936.
- Barba de la Rosa AP, Herrera-Estrella A, Utsumi S, et al. Molecular characterization, cloning and structural analysis of a cDNA encoding an amaranth globulin. *J Plant Physiol* 1996;149:527-532.
- Berova N., Nakanishi K., Woody R.W. *Circular Dichroism: Principles and Applications*, 2a. edición 2000. Editorial Wiley VCH, New York, USA
- Bulheller B. M., Rodger A. and Hirst J. D. Circular and linear dichroism of proteins. *Phys. Chem.* 2007;9:2020–2035
- Castro-Martínez C, Luna-Suárez S, Paredes-López O. Overexpression of a modified protein from amaranth seed in *Escherichia coli* and effect of environmental conditions on the protein expression. *J Biotechnol* 2012;158:59-67. <https://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.12.012>.
- Carrasco-Peña L, Osuna-Castro JA, León-Rodríguez, et al. Modification of solubility and heat-induced gelation of amaranth 11S globulin by protein engineering. *J Agric Food Chem* 2013;61:3509-16.
- Daskaya-Dikmen C, Yucetepe A, Karbancioglu-Guler F, Daskaya H, Ozcelik B (2017) Angiotensin-I-converting enzyme (ACE)-inhibitory peptides from plants. *Nutrients* 2017;9:1– 19.
- Dickinson CD, Scott MP, Hussein EH, et al. Effect of structural modifications on the assembly of a glycinin subunit. *Plant Cell* 1990;2:403-13.
- Eliel E. L., Wilen S. H. and Mander L. N. 1994. *Stereochemistry of Organic Compounds*, Wiley, New York.
- Fasman G.D. 1996. *Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules*. New York, USA: Plenum Publishing Corp.
- Hartmann R. y Meisel H. Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Current Opinion in Biotechnology*. 2007;18, 163-9.
- Higgins T. J. Synthesis and regulation of major proteins in seeds. *Annual Review of plant Physiology* 1984;35:191-221.
- Foltz M, Meynen EE, Bianco V, van Platerink C, Koning TMM., Kloek J. Angiotensin converting enzyme inhibitory peptides from a lactotriptide-enriched milk beverage are absorbed intact into the circulation. *J Nutr.* 2007;137:953– 958.
- Foltz M, Van Buren L, Klaffke W, et al. Modeling of the relationship between dipeptide structure and dipeptide stability, permeability, and ACE inhibitory activity. *J Food Sci* 2009;74:243-51.
- Greene RF, Pace CN. Urea and guanidine hydrochloride denaturation of ribonuclease, lysozyme, α -chymotrypsin and β -lactoglobulin. *J Biol Chem* 1974;249(17):5388-93.

- Katsube T., Gidamis A. B., Kanamori J., Kang I. J., Utsumi S. y Kito M. 1994. Modification tolerability of the hypervariable region of soybean proglycinin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 42:2639:2645.
- Kawasaki T., Seki E., Osajima K., Yoshida M., Asada K., Matsui T. and Osajima Y. Antihypertensive effect of Valyl-Tyrosine, a short chain peptide derived from sardine muscle hydrolyzate, on mild hypertensive subjects. *Journal of Human Hypertension*. 2000;14, 519–523.
- Kelly S. M., Jess T. J., Price N. C. How to study proteins by circular dichroism. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2005;1751; 119 –139
- Kim CS, Kamiya S, Kamori J et al. High-level expression, purification and functional properties of soybean proglycinin from *Escherichia coli*. *Agric Biol Chem* 1990;56(6):1543-50.
- Konishi Y. y Yoshimoto H. Amaranth globulins as a heat-stable emulsifying. *Agricultural and Biological Chemistry*. 1989;53:3327-3328.
- Luna-Suárez S., Medina-Godoy S., Cruz-Hernández A. y Paredes-López O. Expression and characterization of the acidic subunit from 11S Amaranth seed protein. *Biotechnology Journal*. 2008;3:209-219.
- Luna-Suárez S., Medina-Godoy S., Cruz-Hernández A. y Paredes-López O. Modification of the amaranth 11S globulin storage protein to produce an inhibitory peptide of the angiotensin I converting enzyme, and its expression in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*. 2010;148:240-247.
- Matoba N., Doyama N., Yamada Y., Maruyama N., Utsumi S. y Yoshikawa M. Design and production of genetically modified soybean protein with antihypertensive activity by incorporating potent analogue of ovokinin (2-7). *FEBS Letters*. 2001;497, 50-54.
- Matsufuji H, Matsui T, Seki E, et al. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides in an alkaline protease hydrolyzate derived from sardine muscle. *Biosci Biotech Biochem* 1994;58:2244-45.
- Matsui T, Tamaya K, Seki E, Osajima K, Matsumoto K (2002) Absorption of Val–Tyr with *in vitro* Angiotensin I-Converting Enzyme. *Biol Pharma Bull* 25:1228–1230
- Martin SR, Schilstra MJ. Circular dichroism and its application to the study of biomolecules. *Methods Cell Biol* 2008;84:263-293.
- Martin M y Deussen A. Effects of natural peptides from food proteins on angiotensin converting enzyme activity and hypertension. *Critical review in food sciences and nutrition*. 2017;12:1-21
- Medina-Godoy S, Nielsen NC, Paredes-López O. Expression and characterization of a His-tagged 11S seed globulin from *Amaranthus hypochondriacus* in *Escherichia coli*. *Biotechnology Progress*. 2004;20(6):1749-1756.
- Medina-Godoy S, Valdez-Ortiz A, Valverde ME, Paredes-López O. Endoplasmic reticulum-retention C-terminal sequence enhances production of an 11S seed globulin from *Amaranthus hypochondriacus* in *Pichia pastoris*. *Biotechnology Journal*. 2006;1(10):1085-1092.
- Morales-Camacho JI, Domínguez-Domínguez J, Paredes-López O. Overexpression of a modified amaranth protein in *Escherichia coli* with minimal media and lactose as inducer. *Recent Pat Biotechnol* 2013;7:61-70.
- Morales-Camacho JI, Paredes-López O, Espinosa-Hernández E, et al. Expression, purification and thermal stability evaluation of an engineered amaranth protein expressed in *Escherichia coli*. *Electronic J Biotechnol* 2016;22:44-51.
- Osuna-Castro J. A., Rascón Cruz Q., Napier J., Fido R. J., Shewry P. R. y Paredes-López O. Overexpression, purification and *in vitro* refolding of the 11S globulin from amaranth seed in *Escherichia coli*. *Journal and Agricultural and Food Chemistry*. 2000;48:5249-5255.

- Prak K, Nakatani K, Katsube-Tanaka T, et al. Structure-Function relationships of soybean proglycinins at subunit levels. *J Agric Food Chem* 2005;53:3650-57.
- Romero-Zepeda H. y Paredes-López O. Isolation and characterization of amarantin, the 11S amaranth seed globulin. *Journal of Food Biochemistry*. 1996;19:329-339.
- Rosano GL, Ceccarelli EA. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Front Microbiol* 2014;5:1-17.
- Sambrook JE, Fritsch ET, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
- Sanfeng C. y Paredes-López O. Isolation and characterization of the 11S globulin from amaranth seeds. *Journal of Food Biochemistry*. 1997;21:53-65.
- Soriano-Santo J, Escalonada-Buendía H. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory and antioxidant activities and surfactant properties of protein hydrolysates as obtained of *Amaranthus hypochondriacus* L. grain. *J Food Sci Technol* 2015;52:2073-82.
- Sreerama N, Woody RW. Structural composition of β_I - and β_{II} -proteins. *Protein Sci* 2003;12:384-388.
- Tandang-Silvas MR, Cabanos CC, Carrasco-Peña L, et al. Crystal structure of a major seed storage protein, 11S proglobulin, from *Amaranthus hypochondriacus*, insight into its physico-chemical properties. *Food Chem* 2012;135:819-826.
- Tandang MR, Atsuta N, Maruyama N, et al. Evaluation of the solubility and emulsifying property of soybean proglycinin and rapeseed procruciferin in relation to structure modified by protein engineering. *J Agric Food Chem* 2005;53:8736-44.
- Venyaminov, S. Y., y Yang, J. T. Determination of protein secondary structure. In: Fasman editorial. *Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules*; 1996, pp. 69–107. Plenum Press, New York.
- Wright DJ. The seed globulins-part II. In: Hudson, B.J.F, editor. *Developments in food proteins*. London: Elsevier applied science; 1988, p. 119-177.
- Wu J., Aluko RE y Muir AD. Improved method for direct high-performance liquid chromatography assay of angiotensin converting enzyme-catalyzed reactions. *Journal of Chromatography*. 2002;950:125-130.

APÉNDICE A

EXPRESION Y PURIFICACIÓN DE LAS PROTEINAS RECOMBINANTES

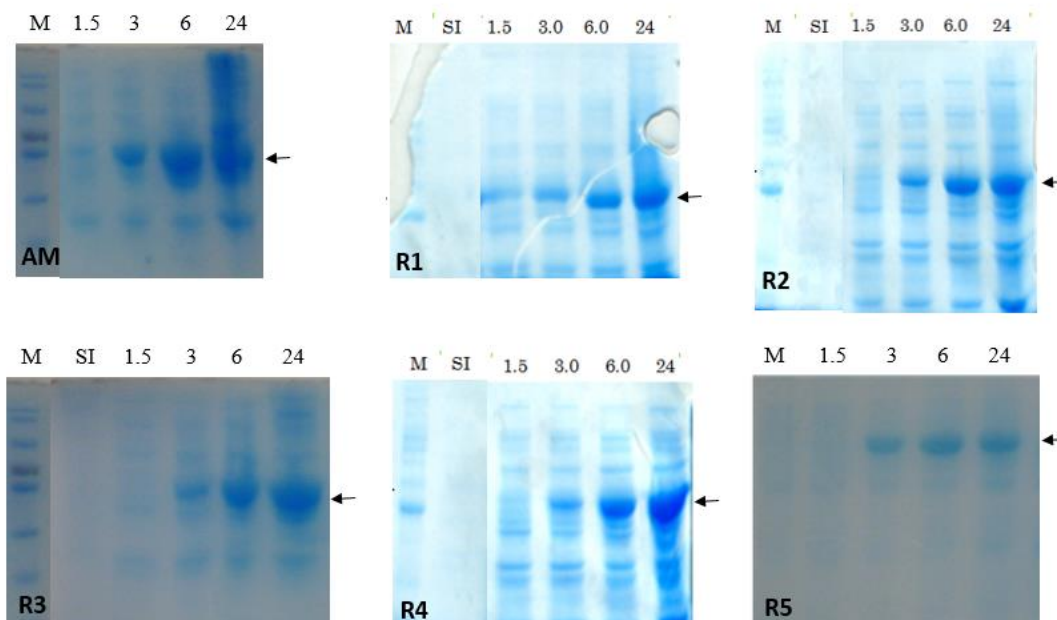


Figura 1. Expresión de las proteínas recombinantes a nivel matraz a diferentes tiempos. M: marcador de peso; SI: sin inducción; 1.5, 3, 6 y 24 corresponden a las horas después de la inducción. La flecha indica la proteína recombinante de interés.

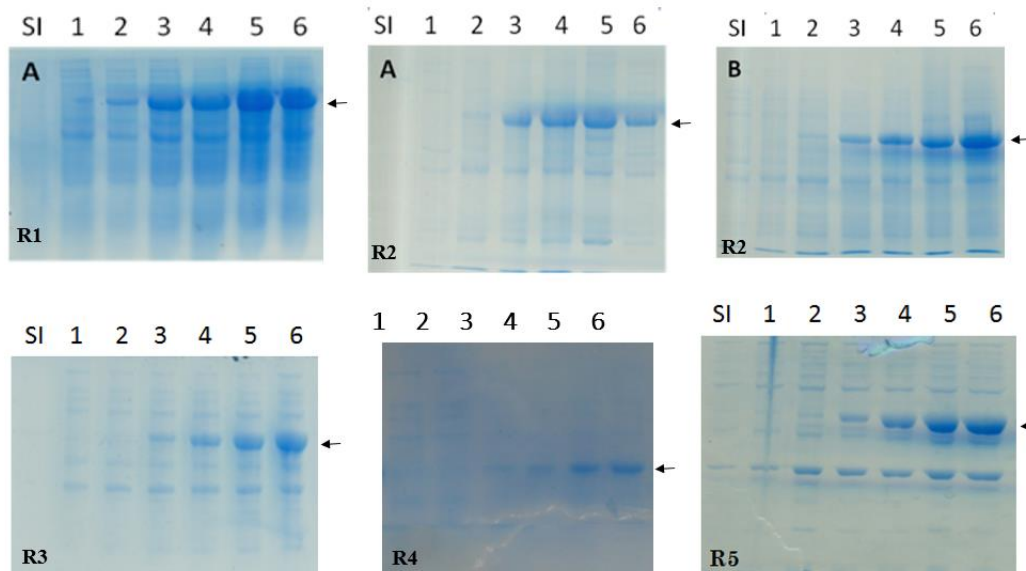


Figura 2. Expresión de las proteínas recombinantes a nivel reactor a diferentes tiempos. M: marcador de peso; SI: sin inducción; 1-6: corresponden a las horas después de la inducción. La flecha indica la proteína recombinante de interés.

APÉNDICE B

FRACCIONES SOLUBLES E INSOLUBLES

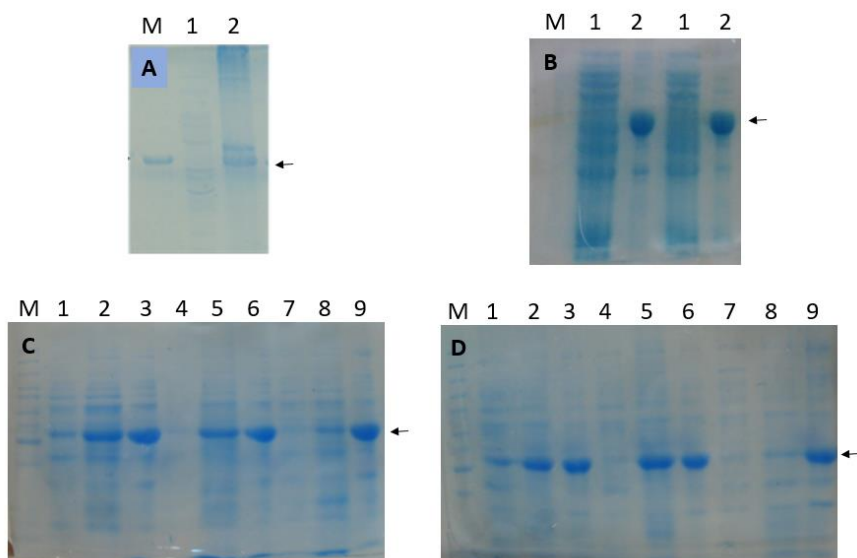


Figura 1. Separación de proteína total soluble e insoluble de células producidas a nivel matraz. A: R1, B: R3 y R5; C: R4 a 30°C; C: R4 a 37°C; M: marcador de peso; 1,4,7: fracción soluble, 2, 5, 8: fracción insoluble, 3, 6, 9: remanente.

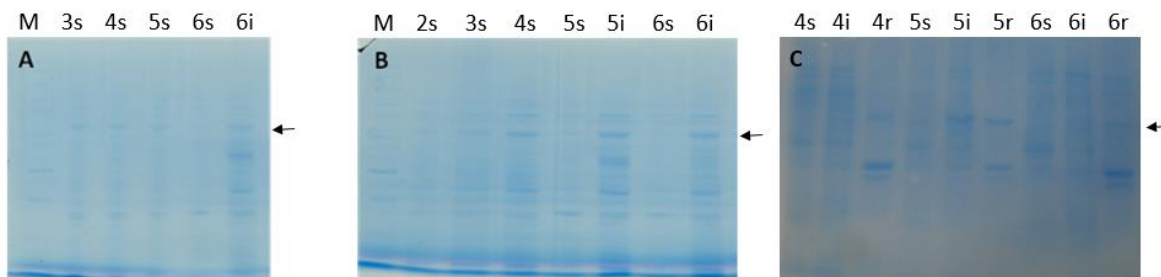


Figura 2. Separación de proteína total soluble e insoluble de células producidas a nivel reactor. A: R2 reactor NALGEN, B: R2 en reactor BIOSTAT; C: R4 reactor NALGEN; M: marcador de peso; s:fracción soluble, i: fracción insoluble, r: remanente; los números corresponden a las horas después de la inducción.



Research article

The insertion of bioactive peptides at the C-terminal end of an 11S globulin changes the structural stability and improves the antihypertensive activity



Edgar Espinosa-Hernández^{a,1}, Jocksan Ismael Morales-Camacho^{b,1}, D. Alejandro Fernández-Velasco^c,
Claudia G. Benítez-Cardoza^d, Flor de Fátima Rosas-Cárdenas^a, Silvia Luna-Suárez^{a,*}

^a Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada, Instituto Politécnico Nacional, CIBA-IPN, Ex-Hacienda San Juan Molino, carretera estatal Tecuexcomac-Tepetitla Km 1.5, 90700 Tepetitla, Tlaxcala, México

^b Departamento de Ingeniería Química, Alimentos y Ambiental, Universidad de las Américas Puebla, 72830 Cholula, Puebla, México

^c Laboratorio de Fisiología e Ingeniería de Proteínas, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM, 04510 Ciudad de México, México

^d Laboratorio de Investigación Bioquímica, Instituto Politécnico Nacional, ENMyH-IPN, 07320 Ciudad de México, México

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 August 2018

Accepted 7 November 2018

Available online 14 November 2018

Keywords:

Amaranth

Antihypertensive peptides

Bioactive

Culture media design

Globulin

Mature seeds

Potato waste

Protein engineering

Protein expression

Protein stability

Storage protein

Thermal stability

ABSTRACT

Background: The 11S globulin from amaranth is the most abundant storage protein in mature seeds and is well recognized for its nutritional value. We used this globulin to engineer a new protein by adding a four valine-tyrosine antihypertensive peptide at its C-terminal end to improve its functionality. The new protein was named AMR5 and expressed in the *Escherichia coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL strain using a custom medium (F8PW) designed for this work.

Results: The alternative medium allowed for the production of 652 mg/L expressed protein at the flask level, mostly in an insoluble form, and this protein was subjected to *in vitro* refolding. The spectrometric analysis suggests that the protein adopts a β/α structure with a small increment of α -helix conformation relative to the native amaranth 11S globulin. Thermal and urea denaturation experiments determined apparent T_m and $C_{1/2}$ values of 50.4°C and 3.04 M, respectively, thus indicating that the antihypertensive peptide insertion destabilized the modified protein relative to the native one. AMR5 hydrolyzed by trypsin and chymotrypsin showed 14- and 1.3-fold stronger inhibitory activity against angiotensin I-converting enzyme (IC_{50} of 0.034 mg/mL) than the unmodified protein and the previously reported amaranth acidic subunit modified with antihypertensive peptides, respectively.

Conclusion: The inserted peptide decreases the structural stability of amaranth 11S globulin and improves its antihypertensive activity.

How to cite: Espinosa-Hernández E, Morales-Camacho JI, Fernández-Velasco DA, et al. The insertion of bioactive peptides at the C terminal end of an 11S globulin changes the structural stability and improves the antihypertensive activity. *Electron J Biotechnol* 2018;37. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2018.11.001>.

© 2018 Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. Production and hosting by Elsevier B.V. All rights reserved. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. Introduction

Hypertension is a health problem worldwide that is mainly observed in adults. This disease is associated with sedentary lifestyle and is treated with drugs that produce side effects [1]. It has been reported that antihypertensive peptides could be an alternative treatment for mildly hypertensive patients or even a supplemental treatment [2,3]. Thus far, many antihypertensive peptides have been

reported; however, few studies have been evaluated to determine their effectiveness *in vivo*. The animal model most frequently employed is the spontaneously hypertensive rats. In humans, only the IPP, VPP, and VY (Valine-Tyrosine) peptides have been evaluated [4]. Regarding the latter peptide, it was demonstrated that it can reduce blood pressure in middle-age hypertensive individuals [5]. Therefore, diverse protein-rich foods have been developed to include bio-functional peptides to be consumed and delivered or absorbed by the gastrointestinal system [3,6,7].

Because of its nutritional value, amaranth seed has attracted attention as an alternative food for future generations. Amaranth 11S globulin (A11Sg) is the most abundant globulin in amaranth seeds and has a high nutritional value. Notably, it is rich in the amino acids

* Corresponding author.

E-mail addresses: silvials2004@yahoo.com.mx, sluna@ipn.mx (S. Luna-Suárez).

¹ These authors contributed equally to this work.

Peer review under responsibility of Pontificia Universidad Católica de Valparaíso.