

**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**



**UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA**

**Sobreexpresión de una enzima proteolítica de *Jacaratia mexicana*  
en *Escherichia coli***

**TESIS**

Presentada para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOPROCESOS**

Por:

**Herrera Ramírez Alejandra Cecilia**

Ingeniero Biotecnólogo

Dirigida por:

**Dra. María del Carmen Oliver Salvador**

**Dr. Jesús Agustín Badillo Corona**

**México, D.F., Junio 2012**



# INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

## ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México siendo las 12:00 horas del día 26 del mes de junio del 2012 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de UPIBI para examinar la tesis titulada:

Sobreexpresión de una enzima proteolítica de Jacaratia mexicana en Escherichia coli

Presentada por el alumno:

Herrera  
Apellido paterno

Ramírez  
Apellido materno

Alejandra Cecilia  
Nombre(s)

Con registro: 

B	1	0	1	5	3	7
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

Maestría en ciencias en Bioprocesos

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

Dr. María del Carmen Oliver Salvador



Dr. Jesús Agustín Badillo Corona

Dr. Juan Silvestre Aranda Barradas

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD PROFESIONAL

INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA

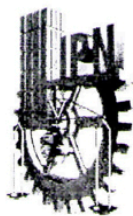
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

Dra. María Guadalupe Ramírez Sotelo

Dr. Claudio Garibay Orijel

### PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

Dr. Juan Silvestre Aranda Barradas



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

***CARTA DE CESIÓN DE DERECHOS***

En la Ciudad de México, D.F. el día 26 del mes de junio del año 2012, el que suscribe Alejandra Cecilia Herrera Ramírez alumno del Programa de Maestría en Ciencias en Bioprocesos con número de registro B101537, adscrito a la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de tesis bajo la dirección de la Dra. María del Carmen Oliver Salvador y el Dr. Jesús Agustín Badillo Corona, y cede los derechos del trabajo titulado "Sobreexpresión de una enzima proteolítica de *Jacaratia mexicana* en *Escherichia coli*" al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, las gráficas o los datos del trabajo sin el permiso expreso del autor o del director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección [alececyhr@gmail.com](mailto:alececyhr@gmail.com), [oliveripn@hotmail.com](mailto:oliveripn@hotmail.com). Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

---

IBT. Alejandra Cecilia Herrera Ramírez

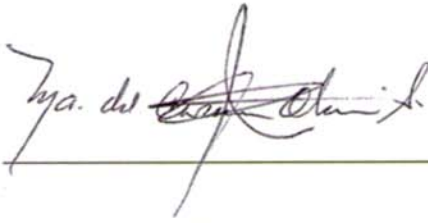
---

## Declaración de originalidad

“Yo declaro que esta tesis, así como los resultados en ella reportados, son producto de mi trabajo y que hasta donde yo sé, no contiene material previamente publicado o escrito por otra persona, ni tampoco contiene material que haya sido utilizado para obtener algún grado o diploma en alguna otra institución educativa excepto donde se reconoce como tal. Declaro igualmente que hago justo reconocimiento en la tesis a las personas que contribuyeron con su trabajo y, finalmente, declaro que esta tesis es producto de mi propio trabajo con el apoyo permitido de terceros en cuanto a la concepción del proyecto, al estilo de la presentación o a la expresión escrita.”



IBT. Alejandra Cecilia Herrera Ramírez



Vo. Bo. Director de tesis  
Dra. Ma. Carmen Oliver Salvador



Vo. Bo. Director de tesis  
Dr. Jesús Agustín Badillo Corona

---

## Agradecimientos

El presente proyecto de investigación se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular de la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología (UPIBI) del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección y supervisión de la Dra. María del Carmen Oliver Salvador y el Dr. Jesús Agustín Badillo Corona.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y al Programa Institucional de Formación de Investigadores (PIFI-IPN) (Clave SIP 20110944 y 20121097) por el apoyo financiero otorgado para la realización de este proyecto.

Gracias al Instituto Politécnico Nacional (IPN) por permitirme realizar mis estudios de postgrado y brindarme las herramientas para mi formación profesional.

A la Dra. María del Carmen Oliver Salvador y al Dr. Jesús Agustín Badillo Corona por guiarme en este proceso de formación en el área de investigación, por su paciencia y compromiso mostrados a lo largo del proyecto, y sobre todo, por ser personas con altos valores humanos que hacen de ellos un ejemplo a seguir.

---

## Resumen

Las proteasas cisteínicas son importantes debido a que participan en procesos fisiológicos celulares fundamentales así como en procesos patológicos de mamíferos. Además, las proteasas cisteínicas de origen vegetal son utilizadas en la industria cervecera, alimentaria y farmacéutica. *Jacaratia mexicana*, planta silvestre, contiene proteasas miembros de la familia de la papaína CI como la mexicana y quimomexicana que tienen mayor actividad enzimática que la papaína. Dada la importancia científica y de aplicaciones industriales de esta enzima, en esta tesis se propone una alternativa de producción de dichas enzimas de *J. mexicana* mediante la sobreexpresión de estas en *Escherichia coli* y en *Pichia pastoris*.

Para lograr los objetivos, se diseñó y construyó un sistema de expresión: I) con el vector pET28b que contiene el promotor T7. La construcción permitió la expresión de las proteasas recombinantes JmCP4 (péptido señal, pro-péptido y proteína madura) y JmCP5 (pro-péptido y proteína madura) en *E. coli* BL21star (DE3). La expresión de las proteasas recombinantes se confirmaron con western blot con anticuerpos anti-mexicana y zimografía. Con las cepas transformadas de *E. coli* BL21star (DE3) se lograron rendimientos de proteína pura JmCP4 (10 mg/L) con actividad específica de 29.8 U/mg para JmCP4 y de 21.7 U/mg para JmCP5; y II) el gen JmCP4 de *J. mexicana* fue clonado en el vector comercial pPIC9 y expresado en *P. pastoris* GS115 con el promotor AOX1. La proteasa JmCP4 fue expresada como zimógeno (pro-péptido y proteína madura) 2 días después de la inducción con metanol. La cepa obtenida, *P. pastoris* GS115-JmCP produce y secreta una proteasa cisteínica al medio de cultivo con un rendimiento estimado de 23 mg/L. Se determinó que la proteína de interés corresponde a una proteína de 36 kDa por SDS-PAGE, con western blot y por zimograma. La proteína presentó actividad específica de 91.9 U/mg aprox. 3 veces mayor a la de papaína purificada y cristalizada 2X de una preparación comercial.

Por primera vez, se cuenta con dos sistemas de producción de estas proteasas de *J. mexicana* en *E. coli* BL21 y *P. pastoris* GS115-JmCP4, cepas obtenidas en este trabajo.

---

## Abstract

Papain-like cysteine proteases are important and the most numerous family of the cysteine protease class. They are involved in a fundamental physiological process of plant cells. And papain-like cysteine proteases have been identified as critical components of the pathological process of mammals. Moreover, plant cysteine proteases are used in brewery, food and pharmaceutical industry. *Jacaratia mexicana* wild plant contains papain-like cysteine proteases family (C1) like mexicain and chymomexicain. The goal of this work was to obtain two alternative systems to produce active cysteine proteases from *J. mexicana* by heterologous expression systems, *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*.

To reach these objectives expression systems were designed and constructed: I) with pET28b vector with T7 promoter. This system over-expressed recombinant JmCP4 (signal peptide, pro-peptide and mature protein) JmCP5 (pro-peptide and mature protein) in *E. coli* BL21star (DE3). The recombinant proteases were identified by western blot and zymography. The procedure yielded purified mature enzyme JmCP4 (10 mg/L) of active enzyme of *E. coli* culture. Specific activity was 29.8 U/mg of JmCP4 and 21.7 U/mg of mCP5; and II) cysteine protease gene of *J. mexicana* was cloned in pPIC9, and expressed in the heterologous *Pichia pastoris* GS115 with the AOX1 promoter. Protease JmCP4 was expressed as zymogene (pro-peptide y mature protein) two day of growth after induction with methanol. *P. pastoris* GS115-JmCP produced and secreted a recombinant cysteine protease with an estimated yield of 23 mg/L. The recombinant protease showed a 36-kDa band in SDS-PAGE and was positive by western blot and zymogram. The recombinant protease JmCP4 had a specific activity of 91.9 U/mg; this value is 3 times higher than a purified papain commercial preparation.

Two systems of cloning and expression of CPs from *J. mexicana* (*E. coli* BL21 y *P. pastoris* GS115-JmCP4) are reported here for the first time. These systems were obtained in this thesis.

---

# Índice

<b>Resumen</b> .....	v
<b>Abstract</b> .....	vi
<b>1. Introducción</b> .....	<b>1</b>
1.1 Proteasas.....	1
1.1.1 Proteasas citeínicas .....	2
1.1.2 Proteasas cisteínicas de plantas .....	3
1.1.3 Importancia de las proteasas cisteínicas.....	4
1.2 <i>Jacaratia mexicana</i> .....	5
1.2.1 Mexicaína .....	6
1.2.2 Genes de proteasas cisteínicas de <i>J. mexicana</i> .....	7
1.3 Expresión de proteasas cisteínicas .....	10
1.3.1 Expresión de proteínas recombinantes en <i>Escherichia coli</i> .....	11
1.3.2 Expresión de proteínas recombinantes en <i>Pichia pastoris</i> .....	14
<b>2. Justificación</b> .....	<b>19</b>
<b>3. Objetivos</b> .....	<b>20</b>
3.1 Objetivo general .....	20
3.2 Objetivos particulares .....	20
<b>4. Materiales y métodos</b> .....	<b>21</b>
4.1 Expresión de JmCP en <i>Escherichia coli</i> .....	21
4.1.1 Microorganismos .....	21
4.1.2 Vectores .....	22



---

4.1.3	Medios de cultivo .....	24
4.1.4	Digestión con enzimas de restricción .....	24
4.1.5	Reacción de desfosforilación .....	24
4.1.6	Reacción de ligación .....	24
4.1.7	Preparación de células electrocompetentes de <i>E. coli</i> .....	25
4.1.8	Transformación de células de <i>E. coli</i> .....	25
4.1.9	Fermentación de <i>E. coli</i> transformada con pET28bJmCP .....	26
4.1.10	Lisis celular .....	26
4.1.11	Desnaturalización de cuerpos de inclusión .....	26
4.1.12	Purificación de la proteína recombinante .....	27
4.1.13	Plegamiento y activación de la proteína recombinante .....	27
4.1.14	Extracción de la proteína total de <i>E. coli</i> .....	28
4.1.15	Proteína obtenida durante el proceso de purificación .....	28
4.2	Expresión de JmCP en <i>Pichia pastoris</i> .....	29
4.2.1	Microorganismos .....	29
4.2.2	Vector .....	29
4.2.3	Medios de cultivo .....	31
4.2.4	Amplificación de los genes JmCP .....	33
4.2.5	Reacción simultánea digestión y ligación en pBSKII .....	34
4.2.6	Digestión con enzimas de restricción .....	34
4.2.7	Reacción de ligación en pPIC9 .....	35
4.2.8	Linealización y purificación del vector pPIC9JmCP.....	35
4.2.9	Preparación de células <i>P. pastoris</i> electrocompetentes .....	35
4.2.10	Transformación de células de <i>P. pastoris</i> .....	36
4.2.11	Extracción de ADN genómico de <i>P. pastoris</i> .....	36

---

4.2.12	Análisis de cepas transformadas .....	37
4.2.13	Fermentación de <i>P. pastoris</i> transformadas con pPIC9JmCP.....	38
4.2.14	Purificación de la proteína recombinante .....	38
4.2.15	Proteína extracelular obtenida en <i>P. pastoris</i> .....	38
4.3	Análisis de ADN .....	39
4.3.1	Minipreparación de ADN plasmídico por lisis alcalina.....	39
4.3.2	Minipreparación de ADN plasmídico utilizando kit .....	39
4.3.3	Electroforesis de ADN en geles de agarosa .....	40
4.3.4	Determinación de la concentración de ADN .....	41
4.3.5	Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa y reacciones de PCR .....	41
4.3.6	Secuenciación de ADN .....	42
4.4	Análisis de proteínas .....	42
4.4.1	Determinación de la concentración de proteína .....	42
4.4.2	SDS-PAGE .....	43
4.4.3	Transferencia de proteínas .....	44
4.4.4	Western blot .....	45
4.4.5	Zimograma .....	45
4.4.6	Prueba de actividad enzimática .....	46
<b>5.</b>	<b>Sobreexpresión en <i>Escherichia coli</i></b> .....	<b>47</b>
5.1	Construcción del vector de expresión .....	47
5.2	Expresión de JmCP .....	49
5.3	Purificación de la proteasa recombinante .....	51
5.4	Identificación inmunoenzimática de la proteasa recombinante .....	54

---

5.5	Análisis de la actividad proteolítica por zimografía .....	55
5.6	Actividad de las proteasas JmCP4 y JmCP5 sobre un sustrato sintético .....	56
5.7	Discusión .....	57
5.8	Conclusiones .....	61
<b>6.</b>	<b>Sobreexpresión en <i>Pichia pastoris</i></b> .....	<b>62</b>
6.1	Construcción de pPIC9JmCP para la transformación de <i>P. pastoris</i> .....	62
6.2	Evaluación de la integración de JmCP en el genoma de <i>P. pastoris</i> .....	65
6.3	Expresión de JmCP4 en <i>P. pastoris</i> .....	68
6.4	Identificación inmunoenzimática de la proteína JmCP4 .....	70
6.5	Análisis de la actividad proteolítica por zimografía .....	71
6.6	Actividad de la proteasas JmCP4 sobre un sustrato sintético .....	72
6.7	Discusión .....	73
6.8	Conclusiones .....	76
<b>7.</b>	<b>Perspectivas</b> .....	<b>77</b>
<b>8.</b>	<b>Referencias</b> .....	<b>78</b>

---

## Índice de Figuras

<b>Fig.1</b>	Representación esquemática de la organización de los genes CPs de <i>J. mexicana</i> .....	9
<b>Fig.2</b>	Modelo molecular tridimensional de CPs de <i>J. mexicana</i> .....	10
<b>Fig.3</b>	Mapa del plásmido pET28b.....	23
<b>Fig. 4</b>	Región de expresión y clonaje del plásmido pET28b .....	23
<b>Fig. 5</b>	Mapa del plásmido pPIC9 .....	30
<b>Fig. 6</b>	Región de expresión y clonaje del plásmido pPIC9 .....	30
<b>Fig. 7</b>	Electroforesis en gel de agarosa de la digestión de pET28bJmCP4 y pET28bJmCP5 ....	48
<b>Fig. 8</b>	Expresión de la proteína recombinante JmCP4 en <i>E. coli</i> BL21.....	50
<b>Fig. 9</b>	Expresión de la proteína recombinante JmCP5 en <i>E. coli</i> BL21.....	50
<b>Fig. 10</b>	Purificación de JmCP4 en columna de Ni-NTA utilizando condiciones desnaturalizantes	52
<b>Fig. 11</b>	Purificación de JmCP4 en columna de Ni-NTA utilizando condiciones nativas .....	52
<b>Fig. 12</b>	Purificación de JmCP5 en columna de Ni-NTA utilizando condiciones desnaturalizantes	53
<b>Fig. 13</b>	Purificación de JmCP5 en columna de Ni-NTA utilizando condiciones nativas .....	53
<b>Fig. 14</b>	Western blot de la proteína recombinante JmCP producida en <i>E. coli</i> BL21 .....	54
<b>Fig. 15</b>	Zimograma SDS-PAGE-gelatina de JmCP producida en <i>E. coli</i> BL21 .....	55
<b>Fig. 16</b>	Representación esquemática de la construcción del vector de expresión pPIC9JmCP....	63
<b>Fig. 17</b>	Electroforesis en gel de agarosa de la digestión de pPIC9JmCP4 y pPIC9JmCP5 .....	64
<b>Fig. 18</b>	Representación esquemática de la integración de pPIC9JmCP en <i>P. pastoris</i> .....	66
<b>Fig. 19</b>	Análisis por PCR de cepas <i>Pichia</i> transformadas con pPICJmCP .....	68
<b>Fig. 20</b>	Expresión de la proteína recombinante JmCP4 en <i>P. pastoris</i> GS115.....	69
<b>Fig. 21</b>	Western blot de la proteína recombinante JmCP4 producida en <i>P. pastoris</i> GS115 .....	70
<b>Fig.22</b>	Zimograma SDS-PAGE-gelatina de JmCP4 producida en <i>P. pastoris</i> GS115.....	71

---

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b>	Expresión de proteasas cisteínicas en <i>E. coli</i> .....	12
<b>Tabla 2.</b>	Expresión heteróloga de proteasas cisteínicas en <i>P. pastoris</i> .....	17
<b>Tabla3.</b>	Genotipos de las cepas de <i>E. coli</i> .....	21
<b>Tabla 4.</b>	Genotipos y fenotipos cepas de <i>P. pastoris</i> .....	29
<b>Tabla 5.</b>	Iniciadores usados en la secuenciación de JmCP .....	34
<b>Tabla 6.</b>	Iniciadores usados en la amplificación de JmCP .....	42
<b>Tabla 7.</b>	Actividad de las proteasas recombinantes producidas en <i>E. coli</i> .....	56
<b>Tabla 8.</b>	Actividad de la proteasa recombinantes producida en <i>P. pastoris</i> .....	72

---

## Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleicocomplementario
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
BAEE	N-Benzoil-L-Arginina Étil Éster
BAPNA	N-benzoil-arginina-p-nitroanilida
BSA	Albúmina de suero bovino
CP	Proteasa cisteínica
Cys	Cisteína
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidad óptica
EC	Número de clasificación de la Comisión de Enzimas
EDTA	Ácido hidroxietilendiaminotetracético
GFP	Proteína de la verde fluorescente
HCN	Ácido cianhídrico
HCl	Ácido clorhídrico
His	Histidina
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia
IPTG	Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido
kDa	Kilodaltones
JmCP	Proteasa cisteínica de <i>Jacaratia mexicana</i>
L	Litro
mg	Miligramo
mL	Mililitro
mM	Milimolar
msnm	Metros sobre el nivel del mar
NTA	Ácido nitrilotriacético
pb	Pares de bases
pH	Potencial de hidrógeno
SDS	Dodecilsulfato sódico
rpm	Revoluciones por minuto
TBE	Disolución tampón de Tris-borato-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletlenodiamina
V	Voltaje
$\mu$ g	Microgramo
$\mu$ L	Microlitro
$\mu$ M	Micromolar

---

# 1. Introducción

## 1.1 Proteasas

Las proteasas también llamadas peptidasas, proteasas, enzimas proteolíticas o proteinasas, son enzimas que llevan a cabo la hidrólisis de enlaces peptídicos. Peptidasa es el término descrito en la Nomenclatura de las Enzimas del Comité de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (NC-IUBMB) para cualquiera de las proteínas que hidrolizan enlaces peptídicos (Harley, 1960). Desde el punto de vista industrial, son el tipo de enzimas más importante porque representan alrededor del 60% del total de las enzimas comercializadas en el mundo. La amplia distribución de proteasas entre plantas, animales y microorganismos demuestra que son necesarias para la supervivencia de los organismos y juegan funciones importantes en diversos procesos biológicos (Demain y Vaishnav, 2009).

La variedad en el comportamiento catalítico de las peptidasas hace difícil su clasificación siguiendo las reglas establecidas para el resto de las enzimas, y en su lugar se han utilizado tres criterios para su clasificación: (i) reacción catalizada; (ii) naturaleza del sitio activo; y (iii) relaciones evolutivas con base a su estructura tridimensional. De acuerdo a la reacción catalizada por estas enzimas, la NC-IUBMB las ha clasificado en el grupo 3 (hidrolasas) y subgrupo 4 (hidrolasas de enlaces peptídicos). La subclase 3.4 a su vez puede ser subdividida en endo o exo peptidasas (amino-terminal o carboxilo-terminal) dependiendo de su habilidad para hidrolizar enlaces peptídicos internos o localizados al final de la cadena polipeptídica; las endopeptidasas son más importantes desde el punto de vista industrial (Rawlings y Barret, 1960; Barret y Buttle., 1985).

Comúnmente se ha establecido la clasificación de proteasas de acuerdo a la naturaleza de su sitio catalítico (Barret y Buttle, 1985), en la cual las proteasas son divididas en seis clases de acuerdo a su sitio activo: endopeptidasas serínicas (EC 3.4.21); endopeptidasas cisteínicas, formalmente denotadas como tiol proteasas (EC 3.4.22); endopeptidasas aspárticas, primeramente conocidas como proteasas ácidas (EC 3.4.23); endopeptidasas glutámicas (EC 3.4.24); metalo-endopeptidasas (EC 3.4.25), endopeptidasas treonínicas

---

(EC 3.4.26), además se incluye otro grupo en donde no se ha identificado el modo de acción (EC 3.4.99). Las proteasas serínicas, cisteínicas y treonínicas son catalíticamente muy diferentes a las aspárticas y metaloproteasas en que el nucleófilo del sitio catalítico del grupo formado es parte de un aminoácido, mientras que en los últimos dos es activado por una molécula de agua).

Barret y Rawlings (2005) clasificó a las proteasas de acuerdo a la secuencia de aminoácidos y relaciones evolutivas entre familias y clases. Las proteasas se sitúan en la misma familia si muestran la suficiente homología en su secuencia, y se cree que las familias tienen un ancestro común localizado en la misma clase. Los nombres de las familias y clases en la base de datos MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk>) está formada por las letras S, C, T, A, G, M, y U, las cuales hacen referencia a los mecanismos de catálisis. De cualquier forma, algunas clases son un tipo de mezcla que contienen dos o más mecanismos de catálisis y son designados con la letra P. Las proteasas más frecuentemente encontradas en plantas son del grupo de las cisteínicas (CPs), aspárticas (APs) y serínicas (SPs).

### **1.1.1 Proteasas cisteínicas**

Las proteasas cisteínicas (CPs) están ampliamente distribuidas en los organismos vivos, se encuentran tanto en procariontes como en eucariontes (p.e. bacterias, parásitos, plantas, invertebrados y vertebrados) (Rao et al., 1998). Alrededor de veinte familias de peptidasas cisteínicas (C1-C20) han sido reconocidas. La actividad de todas las proteasas cisteínicas depende de una diada catalítica que consiste en un residuo de cisteína e histidina, el orden de residuos Cys e His (Cys-His o His-Cys) difiere entre familias (Grudkowska y Zagdanska, 2004).

Las proteasas cisteínicas son activas sólo en presencia de agentes reductores tales como cisteína, sin embargo el grupo SH se puede oxidar reversiblemente y puede recuperar la actividad en presencia de reductores como la cisteína o el  $\beta$ -mercaptoetanol. De acuerdo a la especificidad de la cadena proteica, estas enzimas se dividen en cuatro grupos: (i) las



---

tipo papaína (C1), (ii) las tipo tripsina con preferencia de corte en el residuo de arginina, (iii) las específicas por el ácido glutámico, y (iv) otros tipos (Baretty Rawlings, 2005).

### **1.1.2 Proteasas cisteínicas de plantas**

Una gran variedad de proteasas cisteínicas han sido identificadas, aisladas y estudiadas del látex de varias familias de plantas como *Asteraceae*, *Caricaceae*, *Moraceae*, *Asclepiadaceae*, *Apocynaceae* y *Euphorbiaceae*, entre las que se encuentran la quimopapaína, bromelaína, mexicaína, caricaína, ficina, actinidina, entre otras (González et al., 2011). El látex es secretado por las plantas cuando sufren daño físico en sus tejidos, se han reportado más de 12 a 35 mil especies que lo presentan (Salas et al., 2008). En muchas plantas de las familias *Caricaceae*, *Moraceae* y *Asclepiadaceae* se ha encontrado gran cantidad de proteínas y enzimas, como por ejemplo, las proteasas de *Carica papaya* (*C. papaya*) han demostrado conferir un mecanismo de defensa en contra insectos herbívoros porque retardan el crecimiento o matan a la larva de los insectos (Arribere et al., 1998; Dussourd et al., 1991; Farrel et al., 1991; Konno et al., 2004; Grudkowska y Zagdanska, 2004).

En plantas, las CPs son sintetizadas como preproteinasas (zimógenos) y procesadas autocatalíticamente, generalmente tienen un prodominio autoinhibitorio que es removido para activar a la enzima (Bryan, 2002), su activación depende del pH y de la presencia de activadores o inhibidores de proteasas (van del Hoorn et al., 2004). La actividad proteolítica de las CPs sobre sustratos sintéticos es una forma simple para conocer la especificidad de corte de las enzimas proteolíticas, ofreciendo información importante dentro de las aplicaciones biotecnológicas, así como en la producción de péptidos bioactivos de proteínas en alimentos (Dubbey, 2007).

De manera general, las proteasas cisteínicas están involucradas en un gran número de procesos celulares, incluyendo mecanismos de defensa, proteólisis durante la senescencia, muerte celular programada, maduración de proteínas, degradación y plegamiento de proteínas, remoción de proteínas mal plegadas, maduración de zimógenos y hormonas

---

peptídicas, corte de señales de proteínas antes de la integración en organelos, control del metabolismo y homeostasis por disminución de la cantidad de proteínas, (Del Pozo y Lam, 1998; Jones y Mullet, 1995; Koizumi et al., 1993; Palma et al., 2002; Tian et al., 2000). En plantas, los ARNm que codifican para proteasas son acumulados bajo ambientes de estrés, temperatura baja, sequía, salinidad y daños a los tejidos (Estelle, 2001). Los incrementos en la expresión de los ARNm de las CPs han sido encontrados en diferentes etapas del desarrollo de las plantas como la germinación de semillas (Cervantes et al., 1994) y fotomorfogenesis en el desarrollo de semillas, foto-inhibición en el cloroplasto, formación de elementos traqueales y la senescencia de varios órganos durante la sequía (Cercos et al., 1993; Drake et al., 1996; Lohman et al., 1994; Wagstaff et al., 2002).

### **1.1.3 Importancia de las proteasas cisteínicas**

Las proteasas tienen un papel fundamental en el mercado de enzimas a nivel mundial, estimado en aproximadamente 3 billones de dólares. Las proteasas constituyen el grupo más importante de enzimas industriales utilizadas en la actualidad. Los campos de aplicación de las proteasas son muy diversos, estos incluyen la ciencia y tecnología de los alimentos, la industria farmacéutica, y la manufactura de detergentes. Entre los principales productores en el mundo se encuentran Industrias Novo, Gist-Brocades, Genecor Internacional y Laboratorios Miles (Feijoo y Villa, 2011).

Entre los usos más importantes de las proteasas dentro de la industria alimentaria están la clarificación de cervezas, ablandamiento de carnes, clarificación de jugos de frutas, elaboración de vinos e hidrolizados de proteínas, tratamiento de malta o cebada, extracción de zumos, saborizantes, especias y pigmentos (Demain y Vaishnav, 2009).

En el campo de la medicina, las proteasas cisteínicas han sido identificadas como moléculas clave en enfermedades degenerativas, invasivas y de desordenes del sistema inmune. Las peptidasas humanas representan alrededor de 500 enzimas y cerca del 14% de ellas son motivo de investigación como marcadores moleculares en diversas enfermedades, como por ej. la catepsina K participa en la degradación del hueso y en los osteoclastos por lo que

---

diseño de inhibidores específicos son alternativa en el tratamiento de osteoporosis y diversas formas de artritis (Yamashita et al., 2000; Hou et al., 2002). La catepsina S ha mostrado participar en la presentación del antígeno dependiente del MHC clase II (Riese et al., 1998). Las catepsinas también han estado implicadas en la invasión de tumores y metástasis (Berquin et al., 1994). El creciente interés en el estudio de las proteasas cisteínicas ha estado enfocado a la expresión de proteasas cisteínicas que participan en los procesos de invasión de parásitos que provocan enfermedades como la malaria, enfermedad de Chagas y esquistosomiasis (McKerrow et al., 1999). Las proteasas cisteínicas tipo papaína en organismos parásitos están implicadas en el crecimiento, señalamiento e invasión al huésped y con frecuencia activan factores de virulencia por degradación proteolítica del sistema inmune del hospedero (Sajid et al., 2002). Además se ha establecido una clara asociación entre las proteasas cisteínicas de plantas y tratamientos terapéuticos para el tratamiento de desordenes digestivos, úlceras gástricas y dérmicas de diferentes orígenes, modulación inmunológica y desordenes tumorales y metastáticos (Salas et al., 2008; Silva et al., 2005; Mello et al., 2008; Kaminsky y Zhivotovsky, 2012; Leicalle y Brömme, 2002).

## **1.2 *Jacaratia mexicana***

*Jacaratia* es un género perteneciente a la familia *Caricaceae*, la cual se distribuye desde el sur de México hasta el norte de Argentina; el género cuenta con siete especies de las cuales solo dos han sido reportadas en nuestro país: *Jacaratia mexicana* (*J. mexicana*) y *Jacaratia dolichaula* (*J. dolichaula*). *J. mexicana* es una planta endémica de México nombrada comúnmente bonete, kunché, coaguayote, orejona o papaya de montaña. Se le puede encontrar en altitudes próximas a los 1400 msnm, en áreas de selva baja caducifolia, principalmente en los estados de Morelos, Guerrero, Puebla, Yucatán, Campeche, Jalisco, Michoacán, Veracruz y Oaxaca. Su etapa de floración es de noviembre a enero y los frutos pueden obtenerse de febrero a mayo. Esta planta es caducifolia y llega a medir hasta 15 m de altura, sus ramas son pinnadamente lobadas, recurvadas en los márgenes, el fruto es una baya ovoide generalmente de 13 a 18 cm de largo y 4 a 6 cm de ancho. Las semillas son ovoides de 6 a 7 mm de largo por 4.5 mm de ancho aproximadamente. Su tallo es grueso,

---

inerte, de corteza parda con cicatrices foliares semicirculares transversales y médula porosa. La planta produce látex tanto en tallo como en sus frutos, en mayor cantidad cuando se encuentran inmaduros (Castañeda et al., 1945).

### 1.2.1 Mexicana

Castañeda-Agulló *et al.*, (1942) aislaron, por vez primera, a la denominada “mexicana” a partir del látex de frutos de *Pileus mexicanus syn J. mexicana*, Caricaceae. Y se consideró que esta proteasa cisteínica era la única proteasa (monomórfica) presente en el látex de *J. mexicana*. Estudios realizados sobre la “mexicana” indicaron que presenta características similares a las de la papaína de *Carica papaya*, de la misma familia que *J. mexicana*.

La “mexicana” presentó mayor actividad específica sobre caseína y sobre el sustrato sintético N-Benzoil-L-Arginina Étil Éster (BAEE) y estabilidad en comparación a la papaína (Romero et al., 1976) además, de mayor hidrosolubilidad y que no requería de activadores como el cianuro de sodio y la cisteína para conservar su actividad enzimática.

Briones et al., 1994, demostraron que preparaciones refinadas “mexicana” podía competir favorablemente con la papaína en ciertos procesos de tipo industrial donde esta es empleada.

Por mucho tiempo se consideró a la “mexicana” como proteasa monomórfica. Sin embargo, al haber estudios de purificación con métodos más selectivos, mostraron que la “mexicana” es en realidad un complejo de al menos cinco proteinasas (con pesos moleculares y puntos isoelectricos similares) a las que denominó proteasa: P-I, P-II, P-III, P-IV y P-V, de acuerdo al orden de elución en una columna de intercambio catiónico, siendo la proteasa P-IV es la más abundante por lo que se le nombró mexicana (Oliver, 1999). Esta proteasa cisteínica de 23.8kDa, es estable a altas temperaturas y valores de pH's con actividad de un amplio intervalo de pH (3-10), mostrando tener un máximo de actividad caseinolítica a pH 8.5-9 y presenta una mayor actividad proteolítica sobre el sustrato caseína, así también como también sobre el sustrato sintético N-Benzoil-L-

---

Arginina Étil Éster (BAEE) que la papaína. Se determinó la secuencia de aminoácidos a la mexicana y proteasa P-V (quimomexicana) (Oliver, 1999). La mexicana fue purificada e inhibida con E-64 para su cristalización con el objeto de determinar su estructura 3-D (Moreno *et al.*, 2000, Oliver *et al.*, 2004). El análisis de la estructura 3-D de mexicana-E-64 que la molécula posee dos dominios que están separados por el sitio catalítico formado por los residuos de Cys25 e His159, uno en cada dominio, el primero es abundante en estructuras  $\alpha$ -hélice, mientras que el segundo es abundante en estructuras  $\beta$ -plegadas. Como una proteasa de la familia tipo papaína (C1), contiene siete residuos de Cys los cuales son comunes en esta familia, tres formando tres puentes disulfuro y el residuo siete es Cys25 del sitio activo (Oliver, 1999; Gavira *et al.*, 2007).

### **1.2.2 Genes de proteasas cisteínicas de *J. mexicana***

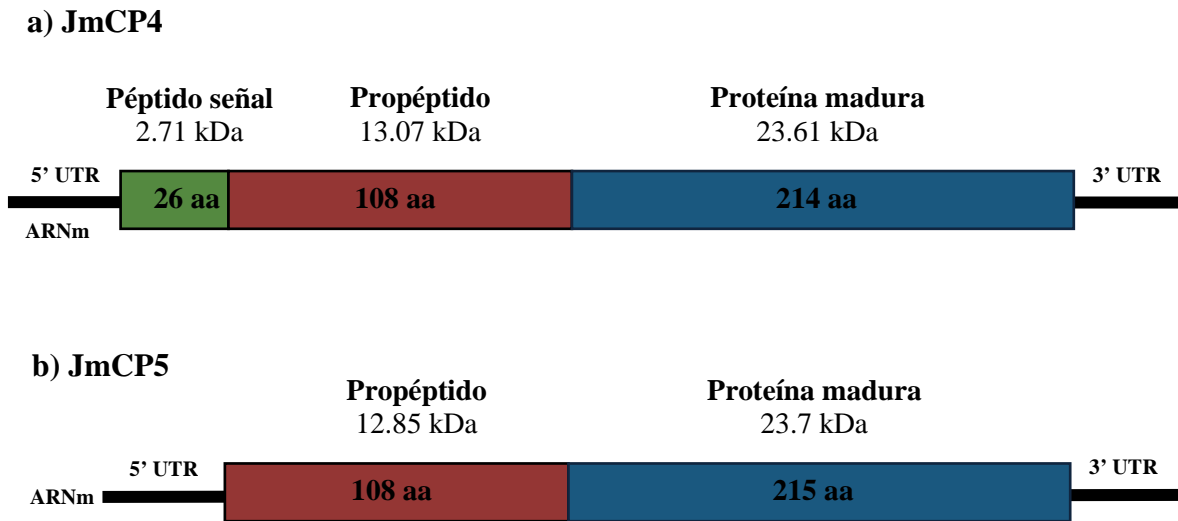
Las peptidasas cisteínicas han sido ampliamente estudiadas y se han aislado cerca de 70 genes de plantas que codifican para estas enzimas. Varios estudios se han enfocado en la identificación de genes de CPs de plantas y su expresión en *E. coli* y levaduras, tal es el caso de *C. papaya* (Taylor *et al.*, 1999), *Ipomoea batatas* (Chen *et al.*, 2009; 2010), *Nicotiana tabacum* (Beyene *et al.*, 2006), *Mesembryanthemum crystallinum* (Forsthoefel *et al.*, 1998), *Daucus carota* (Mitsuchashi *et al.*, 2004), *C. candamarcensis* (Pereira *et al.*, 2001). La identificación de genes de CP utilizando como fuente a las plantas, así como la sobreexpresión de genes de CP de plantas, han resultado alentadores para la producción de proteasas cisteínicas en diversos sistemas celulares. (Brömme *et al.*, 2004; Revell *et al.*, 1993; Taylor *et al.*, 1992; Ueda *et al.*, 2000).

El aislamiento de los genes que codifican para algunas proteasas cisteínicas de *Jacaratia mexicana* forma parte de la línea de investigación de nuestro grupo de trabajo. Para realizar el aislamiento de estas CPs se extrajo el ADN y ARN total de hojas de *J. mexicana*, utilizando el ARN se realizó la síntesis de ADNc, y se amplificó una región interna del gen usando primers degenerados para los sitios conservados de las proteasas cisteínicas. A partir de este fragmento interno se diseñaron primers para aislar el gen completo usando la técnica de 5' y 3' RACE. Todos los productos de PCR fueron

---

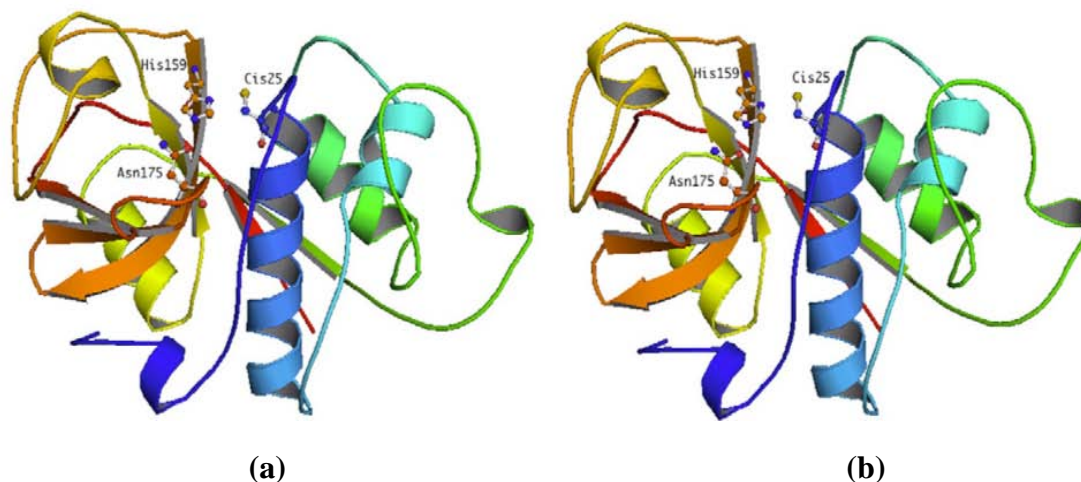
purificados, ligados a un vector de clonación y secuenciados. Con el fin de obtener el gen de ADNc las tres secuencias determinadas se superposieron y se sintetizaron los primers específicos para aislar la secuencia completa de ADNc. El resultado fue la obtención de una secuencia completa de ADNc de 1297 pb, de la cual se caracterizaron dos secuencias de ADN (ORF) denominadas JmCP4 y JmCP5 (Martínez et al., 2012). En la Fig. 1 se presenta el esquema de las secuencias aisladas: (i) la construcción JmCP4 comprende 1044 pb, estacodifica para un polipéptido que tienen un péptido señal (26 aa), propéptido (108 aa) y una región de enzima madura (214 aa), con un total de 348 aa y un peso molecular de 39.4 kDa. (ii) La construcción JmCP5 comprende 969 pb que codifica para un polipéptido sin péptido señal pero con la región completa del propéptido (108 aa) y proteína madura (215 aa) para un total 323 aminoácidos con un peso molecular de 36.6 KDa.

En el análisis entre la homología de JmCP4 y JmCP5 reveló que ambas proteasas exhiben una identidad de entre 56% a 91% con otras proteasas de tipo papaína de diferentes plantas (*J. mexicana*, *Vasconcellea cundinamarcensis*, *Vasconcellea stipulata* y *C. papaya*, entre otras). JmCP4 presenta alta similitud (91%) con la quimomexicaína (P84347) y 83% de similitud con la mexicaína (P84346), mientras que JmCP5 presenta una alta identidad (87%) por la quimiomexicaína y 85% de identidad con la mexicaína. Entre ambas secuencias la identidad es de 88%, con pequeños cambios entre los residuos básicos, ácidos y neutrales. Las cargas en la secuencia de aminoácidos en la estructura de JmCP4 y JmCP5 no tienen un impacto significativo en la estructura terciaria de la CPs cuando se compara con la mexicaína (Gavira et al., 2007; Oliver et al., 2000), por lo que ha supuesto su identidad como isoformas de CPs del látex de *J. mexicana*, como se ha reportado con otras proteasas del tipo de la quimopapaína de las isoformas I a V. (Martínez et al., 2012; Taylor et al., 1992).



**Fig. 1.** Representación esquemática de la organización de los genes CP de *J. mexicana*. Se indica la región del péptido señal, la pro-región y proteína madura de a) JmCP4 y b) JmCP5 (Martínez et al., 2012).

El modelado tridimensional basado en la secuencia de aminoácidos de las estructuras de JmCP4 y JmCP5, muestra una estructura de plegamiento parecido al de las proteasas tipo papaína, en la cual se generan dos dominios (L y R) separados por una hendidura de unión; el primer dominio es abundante en estructuras  $\alpha$ -hélices mientras que el segundo dominio lo es en hojas  $\beta$  (Fig. 2). En el sitio catalítico se conservan los residuos Cys25, Asn175 e His159, revelando 7 residuos de Cys comunes para esta familia, nombrados 22-63, 56-95, 153-200 y Cys25 que se encuentra en estado reducido en el sitio activo (Martínez et al., 2012).



**Fig.2.** Modelo tridimensional de las CPs de *J. mexicana*. Los modelos representan la estructura ternaria prevista por el software SWISS-MODEL y visualizado con PyMOL para (a) JmCP4 y (b) JmCP5 (Martínez et al., 2012).

La obtención de las secuencias de los genes de proteasas cisteínicas de *J. mexicana* provee una alternativa de producción en varios sistemas de expresión y puede ser un paso inicial hacia la comercialización de la enzima.

### 1.3 Expresión de proteasas cisteínicas

En los últimos años, las proteasas de planta han sido objeto de atención en la industria farmacéutica y biotecnológica no solamente por su actividad proteolítica, si no también porque son activas en un amplio intervalo de temperaturas y pHs (Dubey et al., 2007). Debido a que la aplicación industrial de enzimas requiere de bajo costo en su producción así como una gran escala de producción, las enzimas de plantas han sido remplazadas por enzimas de origen microbiano. Todo esto ha incrementado el número de trabajos de proteasas de plantas tanto en desarrollos biotecnológicos, como en la ingeniería de proteínas, pronosticando que, en un futuro cercano se tenga la posibilidad de que las proteasas de plantas tengan mejores propiedades y mayor presencia en la industria.

La creciente demanda de proteínas recombinantes ha propiciado el desarrollo de estudios enfocados a la búsqueda de sistemas de expresión para su producción. Mientras algunas proteínas son expresadas en altos niveles dentro de los organismos en donde se producen de



---

manera natural, en otras se han tenido dificultades para su obtención y requieren de la producción de una proteína recombinante. Los sistemas unicelulares, como las bacterias y levaduras, son utilizados en la producción de varias proteínas recombinantes con aplicaciones industriales y terapéuticas debido a su relativa sencillez del proceso, en especial, a la producción de aquellas proteínas que no requieren procesos postraduccionales como glicosilación (Feijoo y Villa, 2011).

### **1.3.1 Expresión de proteínas recombinantes en *Escherichia coli***

*Escherichia coli* (*E. coli*) es generalmente la primera elección para la expresión de proteínas heterólogas debido a su fácil manipulación, rápido crecimiento, rápida expresión, altos rendimientos, bajo costo de cultivo y modificaciones genómicas sencillas (Swartz et al., 2001). Algunas de las desventajas son la dificultad de expresión de proteínas con cuerpos disulfuro, proteínas no glicosiladas, con endotoxinas, formación de acetato que resulta en toxicidad celular y proteínas como cuerpos de inclusión resultando en proteínas inactivas y que requieren de repliegamiento (Demain y Vaishnav, 2009). Dentro de los retos de utilizar la *E. coli* para la expresión de proteínas están la de asegurar altos índices de transcripción y traducción, el control de toxicidad por el producto del gen heterólogo, el mantenimiento de la solubilidad de la proteasa y la degradación proteolítica de la proteína expresada.

La primera proteasa cisteínica expresada en el sistema de *E. coli* fue la catepsina L (Smith et al., 1989), sin embargo la proteína producida era una variante de la proteína original con muy bajo rendimiento. Tal como se observa en la Tabla 1, las primeras CPs de planta expresadas con éxito fueron la papaína (Taylor et al., 1992) y la caricaína (Revell et al., 1993), desde entonces el sistema de expresión de *E. coli* ha sido exitosamente explotado para la expresión otro tipo de CPs, como las catepsinas de mamíferos, entre las que se encuentran la catepsina B (Kuhelj et al., 1995), catepsina L (Dolinar et al., 1995), catepsina S (Kopitar et al., 1996; Tobbell et al., 2002), catepsina K (D'Alessio et al., 1999; Hwang et al., 2002), catepsina O (Velasco et al., 1994) y catepsina X (Santamaria et al., 1998).

**Tabla 1.** Expresión de proteasas cisteínicas tipo papaína en *E. coli*.

<b>Enzima</b>	<b>Clonación</b>	<b>Rendimiento u Objetivo</b>	<b>Referencia</b>
<b>Papaína</b>	Propapaína	3 mg/L	Choudhury et al., 2009
	Propapaína	3 mg/L	Taylor et al., 1992
	Propapaína	Caracterización de la pro-región	Vernet et al., 1995
	Propapaína	Procesamiento	Cohen et al., 1990
	K174R	Mejoramiento termoestabilidad	Choudhury et al., 2009
	K174R/V32S/G36S	Plegamiento y activación	Revell et al., 1993
<b>Quimopapaína</b>	Proquimopapaína	4-6 mg/L	Taylor et al., 1999
	Proquimopapaína	8-12 mg/L	Choudhury et al., 2009
<b>Caricaína</b>	CMS2MS2	Actividad mitogénica	Corrêa et al., 2011
<b>Catepsina</b>	B, humana	3 mg/L	Kuhelj et al., 1995
	B, <i>L. mexicana</i>	3.5 mg/L	Sanderson et al., 2000
	C, Bovina	Degradado	Komeda et al., 2002.
	K, Humana	50 mg/L	D' Alessio et al., 1999
	L, Humana	1.3 mg/L	Dolinar et al., 1995 Smith et al, 1988
	S, Humana	2-4 mg/L	Kopitaret al., 1996.
<b>Cruzaína</b>	<i>T. cruzi</i>	20-30 mg/L	Eakin et al., 1992

Las estudios iniciales para la expresión de proteasas cisteínicas en *E. coli* no tuvieron éxito debido a dificultades para obtener una proteasa activa. De cualquier forma, estos experimentos revelaron que la remoción de una secuencia péptidoseñal es esencial para la expresión de la proteína, así como la presencia del propéptido para el correcto plegamiento

---

que permita obtener una enzima activa (Taylor et al., 1992). La mayoría de estos inconvenientes han sido superados con la selección de vectores de expresión con promotores fuertemente inducibles, sitios de unión a ribosomas, secuencias señal dirigidas a transportar el producto del gen al compartimento periplásmico, células hospederas con expresión de proteasas deprimida y que las proteasas expresadas tengan una etiqueta para su purificación rápida. Un gran avance en el desarrollo de sistemas de expresión bacterianos fue la introducción del promotor T7 de bacteriófago para el control de proteínas recombinantes en *E. coli*, siendo utilizado ampliamente en la expresión de proteasas tipo papaína (Studier et al., 1991).

Las proteinasas de organismos eucariontes expresadas intracelularmente en *E. coli* son frecuentemente secuestradas dentro de cuerpos de inclusión. Se cree que la asociación de dominios hidrofóbicos durante el plegamiento juega un papel importante en la formación de cuerpos de inclusión. Para proteínas con residuos de cisteína la correcta formación de enlaces disulfuro en el ambiente reductor del citoplasma de *E. coli* pueden contribuir al incorrecto plegamiento y contribuir a la formación de cuerpos de inclusión. Sin embargo, se ha probado que las proteínas purificadas bajo condiciones desnaturizantes pueden volver a ser plegadas correctamente y tener actividad (Wingfield and Palmer, 1995; Hwang et al., 2002; Komeda et al., 2002; Dolinar et al., 1995; Kopitar et al., 1996; D'Alessio et al., 1999).

El replegamiento es el paso crítico del proceso de expresión de proteínas recombinantes, las proteínas son diluidas y los rendimientos disminuyen drásticamente (Tobbel et al., 2002; Hwang et al., 2002). El correcto par redox en los buffers es crítico para el plegamiento, así como la temperatura óptima (4°C) y tiempo de incubación. La renaturalización y plegamiento de proteína solubilizada ocurre durante remoción de agentes desnaturizantes y/o detergentes. Si estos se usan pueden provocar la exposición de regiones hidrofóbicas de la proteína hacia el solvente, proceso que, a menos de que se utilicen condiciones cuidadosamente controladas, puede seguir hacia la formación de agregados insolubles o multímeros solubles inactivos. Estas condiciones controladas son en muchos casos

---

requeridas para evitar la formación de agregados y mantener monómeros de proteína que se plegarán para permitir una completa conformación nativa (Taylor, 1992).

### 1.3.2 Expresión de proteínas recombinantes en *Pichia pastoris*

Las levaduras, organismos eucariontes fungi unicelulares, son con frecuencia utilizados para producir proteínas recombinantes que no son producidas de manera deseable en *E. coli* debido a problemas referentes con el plegamiento o el procesamiento postraduccional (acilación, fosforilación, metilación, hidroxilación, glucosilación, sulfonilación, prenilación, glicación, nitrosilación, nitración, etc). Las cepas de levaduras están genéticamente bien caracterizadas y pueden llevar a cabo muchas modificaciones postraduccionales. A diferencia células de insectos o mamíferos, el trabajo con levaduras es más fácil y menos costoso, además tiene fácil adaptación en procesos de fermentación (Potvin et al., 2010). Las dos cepas más utilizadas por ser extremadamente útiles para la expresión y el análisis de proteínas eucariotas son *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) y la levadura metilotrófica *Pichia pastoris* (*P. pastoris*) (Cregg et al., 2000).

*S. cerevisiae* ofrece ciertas ventajas sobre las bacterias como célula hospedera de clonación (Gellison et al., 1992): (i) tiene una larga historia en el uso de fermentaciones industriales; (ii) puede secretar proteínas heterólogas en el espacio extracelular cuando cuenta con la secuencia señal apropiada unida a genes estructurales, (iii) lleva a cabo la glicosilación de proteínas. De cualquier forma, la glicosilación de *S. cerevisiae* con frecuencia no es aceptable para proteínas de mamíferos porque solo contiene manosa mientras que las proteínas de eucariontes superiores tienen uniones más complejas con otros oligosacáridos. Además, las levaduras glicosilan en exceso los sitios N-terminales para reducir la actividad y la unión al receptor, y en muchos casos tienen como consecuencia problemas inmunológicos. La glicosilación influye en reacciones cinéticas (si la proteína es una enzima), la solubilidad, la vida media en el suero, estabilidad térmica, actividad *in vivo*, inmunogenicidad y la unión a receptor (Demain et al., 2009). La glicosilación en *P. pastoris* es menos extensa que en *S. cerevisiae* (Dale et al., 1999) debido a las cadenas de manosa más cortas, usualmente de 20 residuos comparadas con *S. cerevisiae* con cadenas de

---

50 a 150 residuos. *P. pastoris* carece de  $\alpha$ -1-3-manosil transferasa la cual produce enlaces  $\alpha$ -1-3-manosil terminal en *S. cerevisiae* y causa una alta respuesta antigénica en pacientes (Zhou et al., 2006).

Las levaduras metilotróficas han llegado a ser muy atractivas como hospederas para la producción industrial de proteínas recombinantes a partir de la manipulación de los promotores que controlan la expresión, estos genes están dentro de los más fuertes y más estrictamente regulados por los promotores de la levadura. Los cuatro géneros de levaduras metilotróficas conocidos (*Pichia*, *Hansenula*, *Candida* y *Torulopsis*) muestran una ruta metabólica común que hace posible el uso de metanol como única fuente de carbono. Las células pueden crecer rápidamente en altas densidades (tan altas como 130 g/L) y el nivel de expresión puede ser regulado por una simple manipulación en el medio.

La ruta de secreción de proteínas así como un tipo de N-glicosilación en proteínas ha sido exitosamente lograda en *Pichia* (Choi et al., 2004). Entre las ventajas de las levaduras metilotróficas sobre *S. cerevisiae* como organismo hospedero se encuentran: (i) mayor producción de proteína; (ii) evitan la hiperglicosilación; (iii) el crecimiento es razonablemente mayor en soluciones con metanol las cuales podrían matar a otros microorganismos, (iv) es un sistema barato y de fácil mantenimiento, y (v) integra múltiples copias del ADN foráneo en el ADN cromosómico que tienen como resultado células transformadas estables (Gellison et al., 1992; Cregg et al., 1993).

En respuesta a la regulación transcripcional por inducción de metanol, muchas de las enzimas han sido rápidamente sintetizadas en altos niveles (Gellison et al., 1992). Las enzimas de la ruta del metanol (AOX y DHAS) están presentes en altos niveles cuando las células crecen en metanol pero no son detectables en células que utilizan otra fuente de carbono (glucosa, glicerol o etanol) (Wegner et al., 1990; Veenhuis et al., 1983). Estudios bioquímicos muestran que la utilización del metanol requiere de una ruta metabólica que involucra a la enzima alcohol oxidasa (AOX), la cual cataliza el primer paso en la ruta de la utilización del metanol: la oxidación de metanol a formaldehído y peróxido de hidrógeno.

---

La AOX es secuestrada dentro del peroxisoma junto con la catalasa, la cual degrada el peróxido de hidrógeno a oxígeno y agua. Una porción del formaldehído generado por AOX sale del peroxisoma para ser fuertemente oxidado formando dióxido de carbono por dos deshidrogenasas, reacciones que son una fuente de energía para el crecimiento de células en metanol. El formaldehído remanente para formar los constituyentes celulares por una ruta cíclica que inicia con la condensación de formaldehído con xilulosa 5-monofosfato, una reacción catalizada por tres enzimas peroxisomales dihidroxiacetona sintasa (DHAS). Los productos de la reacción, gliceraldehído 3-fosfato y dihidroxiacetona, salen del peroxisoma y entran a una ruta en el citoplasma que genera xilulosa 5-monofosfato y gliceraldehído 3-fosfato. Existen dos tipos de genes que codifican para la alcohol oxidasa en *P. pastoris*: AOX1 y AOX2; AOX es responsable de la mayoría de la actividad de la alcohol oxidasa en la célula. La expresión del gen AOX1 es controlada por el nivel de transcripción. En células crecidas en metanol, aproximadamente el 5% de ARN poli(A) es de AOX1, en células crecidas en diferentes fuentes de carbono, el mensajero AOX1 no es detectable. La regulación del gen AOX1 está involucrado en un mecanismo de represión adicional al mecanismo de inducción. La presencia de metanol es esencial para inducir altos niveles de transcripción (Cereghino y Cregg, 1999). *P. pastoris* produce altos niveles de proteínas recombinantes en el medio extracelular y no secreta altas cantidades de proteínas endógenas; por consiguiente las proteínas foráneas secretadas por el cultivo son relativamente puras, lo que facilita su separación (Lin et al., 2000). Dentro de las variables claves para maximizar los rendimientos de la expresión de proteínas en levaduras se encuentran la elección del medio de cultivo, la densidad celular y el mantenimiento del intervalo de pH óptimo (Brömme, 2004).

Algunas proteasas cisteínicas tipo papaína producidas en *P. pastoris*, mostradas en la tabla 2, se encuentran la mutante de propapaína Q19E (Dufour et al., 1998); y al igual que en el sistema *E. coli* se han producido CP de mamíferos y parásitos, alcanzando rendimientos de hasta 60 mg/L (Caffrey, et al., 2002) (véase la tabla 2).

**Tabla 2.** Expresión de proteasas cisteínicas tipo papaína en levaduras.

<b>Enzima</b>	<b>Hospedero/Clonación</b>	<b>Rendimiento/Objetivo</b>	<b>Referencia</b>
<b>Papaína</b>	<i>P. pastoris</i> /Propapaína Q19E	Síntesis de amidrazonas	Dufour et al., 1998
	<i>S. cerevisiae</i> /Propapaína	110 µg/L	Vernet et al., 1995
	<i>S. cerevisiae</i> /Propapaína	1.7 mg/L	Ramjee et al., 1993
<b>Catepsina B2</b> ( <i>S. mansoni</i> )	<i>P. pastoris</i> X33/pPICZa	40-60 mg/L	Caffrey, et al., 2002
<b>Catepsina F</b> (humana)	<i>P. pastoris</i> GS115/pPIC9	0.17 mg/L	Somoza et al., 2002
<b>Catepsina K</b> (humana)	<i>P. pastoris</i> GS115/pPIK9K	38 mg/L	Linnevers et al., 1997
<b>Catepsina L</b> (humana)	<i>S. cerevisiae</i> BJ3501/YpDC222	0.0025 mg/L	Carmona et al., 1996
<b>Catepsina L</b> ( <i>C. sinensis</i> )	<i>P. pastoris</i> GS115/pPIC9	10 mg/L	Carmona et al. 1996
<b>Catepsina S</b> (humana)	<i>S. cerevisiae</i> BJ3501/YpDC222	0.17 mg/L	Brömme et al., 1993
<b>Catepsina X</b> (humana)	<i>P. pastoris</i> GS115/pPIC9	5 mg/L	Nagler et al., 1999
<b>Cruzipaína 2</b> ( <i>T. cruzi</i> )	<i>S. cerevisiae</i> BJ3501/YpDC280	0.029 mg/L	Lima, et al., 2001

La mayor ventaja de *Pichia* sobre *E. coli* es que tiene la capacidad de producir enlaces disulfuro y glicosilación de proteínas, en el caso *E. coli* puede producir una proteína mal plegada, la cual es usualmente inactiva o insoluble. Comparada con otros sistemas de expresión como las células S2 de *Drosophila melanogaster* o las células de Ovario de Hamster Chino (CHO), *Pichia* usualmente tiene mejores rendimientos, además las líneas celulares de organismos multicelulares usualmente requieren de medios complejos y de este modo se incrementan los costos de producción. Sin embargo, existen algunas desventajas

---

de utilizar a *Pichia* como hospedero para la expresión de proteínas heterólogas; cierto número de proteínas requiere de chaperoninas para el plegamiento adecuado y *Pichia* es incapaz de producir estas proteínas. Gerngross, 2004 y Hamilton et al., 2006, crearon una cepa capaz de producir eritropoyetina en la glicosilación humana y completamente funcional, esto se logró por el intercambio de enzimas responsables de la glicosilación de esta levadura por enzimas homologas de mamíferos.

El presente trabajo presenta los resultados de la sobreexpresión de enzimas proteolíticas de *J. mexicana* en los sistemas de expresión *E. coli* y *P. pastoris*.



---

## 2. Justificación

Las proteasas cisteínicas de origen vegetal son ampliamente usadas en las industrias alimentaria, farmacéutica y biotecnológica ya que presentan características fisicoquímicas que les confieren mayor estabilidad a la temperatura y tienen una especificidad amplia. Se ha demostrado que las proteasas cisteínicas de *J. mexicana* pueden competir en usos industriales donde es empleada la papaína, además se ha probado que es más estable al pH y a la temperatura. Es así que se plantea una alternativa para la producción de estas enzimas proteolíticas cisteínicas en sistemas heterólogos con las ventajas de producirlas en menor tiempo y mayor cantidad comparadas con la extracción a partir del látex de la planta y al de los cultivos de células vegetales en suspensión.

A pesar de que *J. mexicana* produce grandes cantidades de proteasas cisteínicas en la planta, la disponibilidad de estas proteasas es limitada debido a que la planta es silvestre y solo produce frutos solo dos meses al año. Otra alternativa de producción es por medio de cultivos celulares en biorreactores, sin embargo no se ha logrado optimizar la producción de dichas proteasas.

En nuestro grupo de trabajo se ha logrado el aislamiento de los genes que codifican para diversas enzimas proteolíticas cisteínicas de *J. mexicana* con el propósito de expresarlos en sistemas más controlados y baratos como bacterias y levaduras.

Dada la importancia científica y de aplicaciones, en la industria cervecera y alimentaria así como en usos farmacológicos de las proteasas cisteínicas de plantas, en el presente proyecto se propone la expresión de proteasas de *J. mexicana* en *E. coli* y en *P. pastoris*, con la finalidad de contar con un sistema de producción que permita obtener estas proteasas en forma constante y en menor tiempo.

---

## 3. Objetivos

### 3.1 Objetivo general

Sobreexpresar genes de proteasas cisteínica de *Jacaratia mexicana* en *Escherichia coli* y *Pichia pastoris* como sistemas de producción de enzimas.

### 3.2 Objetivos particulares

1. Diseñar y construir vectores de expresión de los genes JmCP4 y JmCP5 para la transformación de *E. coli* y *P. pastoris*.
2. Comprobar la integración de los genes JmCP en el genoma cromosomal de *E. coli* y *P. pastoris*.
3. Analizar los niveles de producción de las proteasas recombinantes en *E. coli* y *P. pastoris*.
4. Detectar las proteasas recombinantes de *J. mexicana* con anticuerpos anti-mexicana.
5. Evaluar la actividad proteolítica de las proteasas recombinantes.

---

## 4. Materiales y métodos

### 4.1 Expresión de JmCP en *Escherichia coli*

#### 4.1.1 Microorganismo

Se utilizaron las cepas de *E. coli* DH5 $\alpha$  (Invitrogen, EU) y TOP10F' (Invitrogen, EU) como cepas hospederas para la transformación y propagación de plásmidos. La cepa BL21star (DE3) (Invitrogen, EU) de *E. coli* fue utilizada como sistema de expresión del promotor T7. La cepa BL21 es una cepa hospedera de alto rendimiento diseñada para mejorar el rendimiento de una proteína en un sistema de expresión basado en el promotor T7, debido a que la polimerasa T7 sintetiza ARNm más rápidamente que las polimerasas de ARN de *E. coli*, y esto da lugar a transcritos de ARNm no protegidos por los ribosomas, que son luego sometidos a la degradación enzimática por ARNasas endógenas. El nivel reducido de transcripciones en la célula a menudo conduce a niveles considerablemente reducidos de rendimiento de proteína, además las cepas BL21star contienen una mutación en el gen que codifica la ARNasa E, que es una de las principales fuentes de la degradación de ARNm. Las células BL21star mejoran significativamente la estabilidad de las transcripciones de ARNm y aumentan el rendimiento de proteína de expresión T7 basados en vectores inducibles. Los genotipos de las cepas utilizadas se muestran en la tabla 3.

**Tabla 3.** Genotipos de las cepas de *E. coli*.

Cepa	Genotipo
DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> $\Phi$ 80lacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rK <sup>-</sup> , mK <sup>+</sup> ) phoA supE44 $\lambda$ <sup>-</sup> thi-1 gyrA96 relA1
TOP10F'	F' {proAB, lacIq, lacZ $\Delta$ M15, Tn10 (TetR)} mcrA, $\square$ [mrr-hsdRMS-mcrBC), $\square$ 80lacZ $\Delta$ M15, $\square$ acX74, deoR, recA1, $\square$ - araD139, $\square$ (ara-leu)7697, galU, galK, rpsL(StrR), endA1, nupG
BL21 Star (DE3)	F- ompT hsdSB (rB-mB-) gal dcm rne131 (DE3)

---

#### 4.1.2 Vectores

**pBluescript II KS (-)** (Fermentas, CAN): Es un vector de clonación que tiene 2961 pb, está diseñado para la clonación, secuenciación, mutagénesis y transcripción *in vitro*. La expresión del extremo amino de la  $\beta$ -galactosidasa permite la selección entre clonas azules y blancas cuando es introducido a cualquier cepa de *E. coli* inducidas por IPTG y en presencia de X-gal.

**pET-28b (+)** (Novagen, EU): Este es un vector de 5368pb desarrollado para la clonación y expresión de proteínas recombinantes en *E. coli*, usando el promotor fuerte de bacteriófago T7 que es inducido por la ARN polimerasa de la célula hospedera. La polimerasa ARN T7 es muy selectiva y activa casi en su totalidad los recursos de la célula para convertirlos en la expresión del gen objetivo. Los sistemas de expresión basados en la ARN polimerasa del bacteriófago T7 ofrecen como mayor ventaja el que, una vez inducido el promotor T7, la maquinaria de transcripción de la célula huésped no puede competir con la RNA polimerasa del bacteriófago y casi toda la transcripción de la célula tiene lugar a partir del promotor T7. El producto deseado puede comprender más de un 50% de la proteína celular total en pocas horas después de la inducción. Otro beneficio importante de este sistema es que permite mantener silenciados los genes transcripcionales diana en el estado no inducido. pET28b incluye una cola de histidinas y la secuencia de reconocimiento de la trombina en el extremo N-terminal de la región de expresión como se puede apreciar en la Fig. 4. La inserción de dichos aminoácidos facilitan la detección y posterior purificación de la proteína sobreexpresada. Una vez establecido en el hospedero, los plásmidos son transferidos dentro de células de expresión que contienen una copia cromosomal del gen de la polimerasa ARN T7 bajo el control de lacUV5, y la expresión es inducida por adición de IPTG.

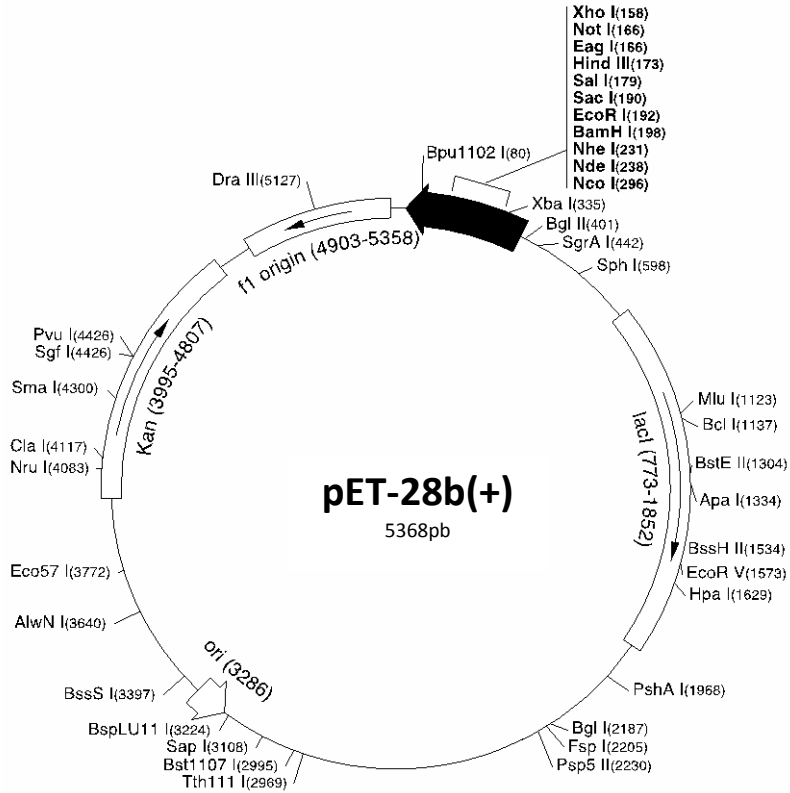


Fig. 3. Mapa del plásmido pET-28b(+).

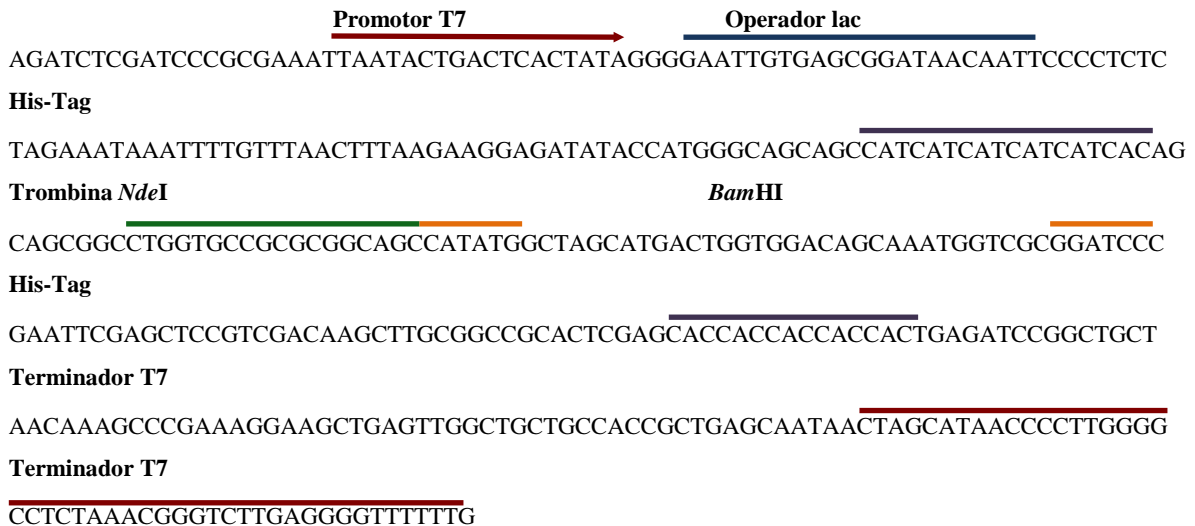


Fig. 4. Región de expresión y clonaje del plásmido pET28b.

---

#### **4.1.3 Medios de cultivo**

Los cultivos bacterianos fueron sembrados en placas de medio LB (1% w/v agar) y conservados a 4°C para periodos cortos, y a -70°C en medio LB líquido (15% v/v glicerol) para periodos largos de conservación.

En la preparación de medio LB se utilizó 10g de triptona, 5g de extracto de levadura y 10 g de NaCl, la solución se aforó a 1 L con agua desionizada. El pH del medio fue ajustado a 7.0 y esterilizado en autoclave por 15 min a 121°C, 15 psi (Sambrook y Russell, 2001).

#### **4.1.4 Digestión con enzimas de restricción**

La restricción se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante utilizando 10 unidades de la enzima *Bam*HI (Fermentas, CAN), 5µg de vector pET28b y buffer *Bam*HI 10X (Tris-HCL 10mM pH 8.0, MgCl<sub>2</sub> 5mM, KCl 100mM, Tritón X-100 0.02%, BSA 0.1 mg/mL) en el volumen de 20µL. La reacción de restricción se dejó toda la noche a 37°C. La reacción fue purificada utilizando el protocolo de la sección 4.3.5.

#### **4.1.5 Reacción de desfosforilación**

Para la desfosforilación del vector pET28b se empleó una unidad de fosfatasa alcalina de camarón (SAP, Fermentas, CAN) de acuerdo a las instrucciones de fabricante adicionando el buffer de reacción 10X de la fosfatasa alcalina de camarón y 1 µg del vector linealizado. La reacción se llevó a cabo durante 30min a 37°C y la reacción fue detenida incubándola por 20 min a 60°C.

#### **4.1.6 Reacción de ligación**

La ligación del vector pET28b desfosforilado con el inserto fue llevada variando la relación de inserto: vector de 1:4 en presencia de 5 unidades de DNA Ligasa T4 (Fermentas, CAN) y el buffer DNA ligasa T4 10X (Fermentas, CAN) en un volumen de 20µL. La reacción se incubó a 4°C toda la noche hasta su uso para la transformación de células competentes.

---

#### 4.1.7 Preparación de células electrocompetentes de *E. coli*

Se seleccionó una sola colonia bacteriana (TOP10F', DH5 $\alpha$  ó BL21star DE3) de una placa de medio LB que fue incubada por 20h a 37°C y se transfirió a 5mL de medio LB líquido. El pre-cultivo fue incubado a 37°C hasta una DO<sub>600nm</sub> de 0.4. Se tomó 1 mL del pre-cultivo y se inoculó en un matraz de 250 mL con 50 mL de medio LB previamente esterilizado, el cultivo fue incubado a 37°C hasta una DO<sub>600nm</sub> 1.2-1.4. Este cultivo fue transferido a un tubo de polipropileno de 50mL estéril e incubado en hielo por 10 min. Las células fueron centrifugadas a 4000 rpm por 10min para formar una pastilla celular, la cual se resuspendió en 25 mL de CaCl<sub>2</sub>0.1M frío (se preparó pesando 11.1 g de CaCl<sub>2</sub> aforando a 1 L con agua desionizada y se esterilizó en autoclave por 15 min a 121°C, 15 psi). Las células se centrifugaron a 4000 rpm por 10min para formar nuevamente una pastilla. Se repitió el proceso para un volumen de 10mL de CaCl<sub>2</sub>. Un último lavado se realizó con 5 mL de CaCl<sub>2</sub> y se hicieron alícuotas de 100 $\mu$ L de las células en tubos de 1.5mL estériles, estas se mantuvieron en hielo y se conservaron a -70°C para su posterior uso (Sambrook y Russell, 2001).

#### 4.1.8 Transformación de células de *E. coli*

En cada experimento de transformación se incluyeron los apropiados controles que consistieron en la transformación del vector pBSK ó pET28b para observar si las células eran competentes, un control negativo donde se adicionó ADN de cepas silvestres y un control positivo que contenía la construcción del vector con el inserto; estas fueron sembradas en cajas de medio LB con o sin el antibiótico adecuado según el vector a expresar. Se agregó 4  $\mu$ L del vector recombinante a las respectivas células en alícuotas, excepto a los controles, se mezcló cuidadosamente y los tubos se incubaron en hielo durante 20min, transcurrido este tiempo se transfirieron 100 $\mu$ L de las células competentes se sembraron por extensión en varilla en placa de medio LB selectivo (en el caso de pBSK ampicilina 50 $\mu$ g/mL y para pET28b kanamicina 30 $\mu$ g/mL). Se mantuvieron las placas a temperatura ambiente hasta que el líquido fue absorbido por el agar. Las placas de incubaron a 37°C por un periodo de 16h hasta la presencia de colonias transformadas de 0.2 a 1 mm de diámetro (Sambrook y Russell, 2001).

---

#### **4.1.9 Fermentación de *E. coli* transformada con pET28bJmCP**

Se tomó una colonia de las placas con células transformadas y se inoculó en un tubo de vidrio con 5mL de medio LB con el antibiótico apropiado, este tubo se dejó incubando 16 h a 37°C con agitación vigorosa. Posteriormente se tomó 1mL del tubo y se inóculo en un matraz de 250mL con 50 mL de medio LB y antibiótico, se incubó a 37°C con agitación vigorosa hasta una  $DO_{600}$  de 0.4, a partir de ese momento los cultivos fueron inducidos con IPTG (1 M esterilizado a través de filtro de 0.22 $\mu$ m y conservado a -20°C). El cultivo se dejó crecer las células 6 h post-inducción, tomando una muestra de 1 mL cada hora y tratada como se indica en la sección 4.1.14.

#### **4.1.10 Lisis celular**

Después de la optimización del protocolo de expresión, se llevó a cabo la expresión en 500 mL durante 6 h a 37°C. Posteriormente, las células fueron centrifugadas a 8500 rpm durante 20 min a 4°C. El sedimento bacteriano fue resuspendido en buffer de lisis para condiciones nativas (50 mM  $NaH_2PO_4$ , 300 mM NaCl, 10 mM imidazol, pH 8.0) que se preparó de acuerdo a las especificaciones del manual para altos niveles de expresión y purificación de proteínas marcadas 6xHis (Qiagen, EU). La mezcla fue suplementada con lisozima (1mg/mL) y se sonicó durante 30 min a 4°C, para después ser sometida a tres choques térmicos (37°C/-70°C) para lisar las células. Adicionalmente, para reducir la viscosidad del lisado, se agregó RNAsa (10  $\mu$ g/mL) y DNAsa (5  $\mu$ g/mL) y se incubó en hielo durante 15 min. El lisado celular fue centrifugado a 8500 rpm durante 20 min a 4°C para separar las fracciones soluble (sobrenadante) e insoluble (pastilla celular), la fracción soluble fue colectada y conservada a 4°C hasta su purificación, la fracción insoluble fue tratada siguiendo la metodología del apartado 4.1.15.

#### **4.1.11 Desnaturalización de cuerpos de inclusión**

El protocolo para lisis de cuerpos de inclusión se siguió de acuerdo a la metodología presentada por Côrrea et al., 2011. La fracción insoluble (incluidos los cuerpos de inclusión) fue resuspendida en buffer de desnaturalización de cuerpos de inclusión (20 mM



---

Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 500 mM NaCl, 25 mM imidazol, 8M urea, pH 7.4) y dejado en agitación suave a 4°C por 2 h. Las proteínas disueltas fueron entonces centrifugadas a 8500 rpm durante 20 min a 4°C. El sobrenadante obtenido fue purificado como se menciona en el apartado 4.1.15.

#### **4.1.12 Purificación de la proteína recombinante**

El protocolo para purificación de proteína recombinante se siguió de acuerdo al manual para altos niveles de expresión y purificación de proteínas marcadas con 6xHis (Qiagen, EU). El lisado bacteriano fue mezclado con 1 mL de Ni-NTA (Qiagen, EU) e incubado durante 60 min a 4°C con agitación suave y constante. La mezcla del lisado se depositó en una columna que contenía una membrana porosa y un tapón en la parte inferior, previamente equilibrada con 2 volúmenes de buffer de lisis. Se removió el tapón y se colectó el filtrado (FT). Posteriormente, la columna fue lavada dos veces con 4mL de solución de lavado (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 20 mM imidazol, pH 8.0) para remover uniones inespecíficas de las proteínas unidas a 6xHis. En seguida la proteína fue eluída tres veces con 4 mL de buffer de elución (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 250 mM imidazol, pH 8.0) para recuperar, monómeros, dímeros y agregados de JmCP. Las muestras fueron tomadas en cada etapa de la filtración para monitorear la retención y elución de la proteína por SDS-PAGE (Sección 4.4.2). En la columna empacada con Ni-NTA y clarificado bacteriano (CL), no se detecta JmCP en el filtrado sugiriendo que la mayor parte de JmCP se encontraba en la matriz NTA-Ni. Durante el paso de lavado (W) no fue removida la proteína JmCP. Las fracciones de elución (E1, E2 y E3) contienen monómeros y dímeros de la proteína JmCP4 y JmCP5 removida. Las muestras fueron tratadas como se indica en la sección 4.1.15.

#### **4.1.13 Plegamiento y activación de la proteína recombinante**

Para el plegamiento de proteínas desnaturalizadas se llevó a cabo el protocolo de Côrrea et al., 2011. Para esto se tomaron 4 mL de la proteína eluída a una concentración de 50-100 µg/mL y se diluyó 10 veces en buffer de plegamiento (50 mM Tris-HCl, 300 mM Arginina,

---

5 mM EDTA, 20 mM cisteína). La solución se incubó a 4°C durante 16 h, seguido de la concentración en una celda de AMICON ULTRA-4, 3K NMWL (Millipore, EU).

#### **4.1.14 Extracción de la proteína total de *E. coli***

Durante la cinética de crecimiento de *E. coli* se tomaron muestras para el análisis en SDS-PAGE, para esto se tomó 1mL de muestra a diferentes tiempos y se colocaron en un tubo estéril de 1.5mL. Las células se centrifugaron a 12000 x g por 5 min, posteriormente se retiró el sobrenadante dejando la pastilla completamente libre de medio. La pastilla fue resuspendida en buffer de carga 4X ( 1mL Tris-HCl 0.5 M pH 6.8, 0.8 mL glicerol, 1.6 mL de SDS 10%, 0.4 mL de 2-β-mercaptoetanol, 0.05% de azul de bromofenol, 3.8 mL de agua desionizada), seguida de un calentamiento a 90°C por 5 min. La muestra fue analizada de acuerdo al protocolo de la sección 4.4.2. El crecimiento de las cepas de *E. coli* fue medido por DO<sub>600</sub>, la concentración de proteína en cada carril fue normalizada para cargar un volumen que representara la concentración de la muestra con una DO<sub>600</sub> de 0.6.

#### **4.1.15 Proteína obtenida durante el proceso de purificación**

De las muestras obtenidas en el proceso de purificación de la proteína de *E. coli* (clarificado, filtrado, lavado y elución) se tomaron 5 μL de muestra y se mezclaron con 15 μL de buffer de carga de proteínas 4X. Las muestras se calentaron a 95°C por 5 min y se cargaron en los pozos de gel de poliacrilamida siguiendo la metodología del apartado 4.4.2.

---

## 4.2 Expresión de JmCP en *Pichia pastoris*

### 4.2.1 Microorganismo

Se utilizaron las cepas de *P. pastoris* GS115 y KM71 (Invitrogen, EU) como cepas de transformación, ambas utilizadas como sistema de expresión del factor  $\alpha$ . Los cultivos celulares se incubaron en placas de medio YPD (1% w/v agar) a 4°C para conservación en periodos cortos y a -70°C en medio YPD líquido (15% v/v glicerol) para periodos largos de conservación. En la tabla 4 se describen los genotipos y fenotipos de las cepas utilizadas de *P. pastoris*.

**Tabla 4.** Genotipos y fenotipos cepas de *P. pastoris*

Cepa	Genotipo	Fenotipo
GS115	his4	Mut <sup>+</sup> His <sup>-</sup>
KM71	aox1 $\Delta$ : :SARG4 his4 arg4	Mut <sup>+</sup> His <sup>-</sup>

### 4.2.2 Vector

**pPIC9** (Invitrogen, EU): Es un vector de expresión de 8023 pb con sitios únicos de restricción *Xho*I, *Sna*BI, *Eco*RI, *Avr*II y *Not*I. Este vector cuenta con un fragmento promotor 5'AOX1 (1-948 pb), un sitio para el primer 5'AOX (855-875 pb), señal de secreción (s) de Factor- $\alpha$  (949-1215 pb), sitio para el primer del Factor- $\alpha$  (1152-1172 pb), un sitio múltiple de clonación (1192-1241 pb), sitio para el primer 3'AOX1 (1327-1347 pb), sitio de terminación de transcripción (TT) 3'AOX1 (1253-1586 pb), sitio de lectura abierto (HIS ORF) (4514-1980 pb), fragmento 3'AOX1 (4870-5626 pb), origen del plásmido pBR322 (6708-6034 pb) y un gen de resistencia a ampicilina (6853-7713 pb).

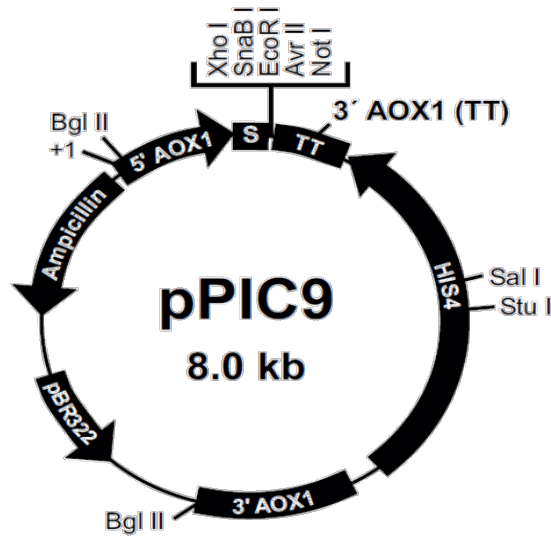


Fig. 5. Mapa del plásmido pPIC9.

773ARNm 5'AOX1(824)

ACAGCAATATATAAACAGAAGGAAGCTGCCCTGTCTTAAACCTTTTTTTTTATCATCATTATTAGCTTAC

Sitio del Primer 5'AOX1(855-875)

TTTCATAATTGCGACTGGTTC AATTGACAAGCTTTTGATTTTAACGACTTTTAACGACAACTTGAGAAG

ATCAAAAAACA ACTAATTATTCGAAGGATCCAAACGATGAGATTCCTTCAATTTTTACTGCAGTTTTAT

Factor- $\alpha$  (949-1215)

TCGCAGCATCCTCCGATTAGCTGCTCCAGTCAACACTACAACAGAAGATGAAACGGCACA AATTCCGG

CTGAAGCTGTCATCGGTTACTCAGATTTAG AAGGGGATTTTCGATGTTGCTGTTTTGCCATTTTCCAACAG

CACAAATAACGGG TTATTGTTTATAAATACTACTATTGCCAGCATTGCTGCTAAAGAAGAAGGGGTATC

Xho I Señal de corte (1204)

NotI

TCTCGAGAAAAGAGAGGGCTGAAGCTTACGTAGAATTCCTAGGGCGGCCGGAATTAATTCGCCTTAGA

CATGACTGTTCTCAGTTCAAGTTGGGCACTTACGAGAAGACCGGTCTTGCTAGATTCTAATCAAGAGGA

Sitio del Primer 3'AOX1 (1327-1347)

TTGCAGAATGCCATTTGCCTGAGAGATGCAGGCTTCATTTTTGATACTTTTTATTTGTAACCTATATAGTA

ARNm 3'AOX1 (1418)

TAGGATTTTTTTTGTC A

Fig. 6.Región de expresión y clonaje del plásmido pPIC9.

---

### 4.2.3 Medios de cultivo

Se prepararon las siguientes soluciones patrón para la composición de los medios de cultivo de *P. pastoris*:

**YNB 10X** (Base de nitrógeno de levaduras 13.4% con sulfato de amonio sin aminoácidos): Se disolvió 134 g de base de nitrógeno para levaduras (YNB, Invitrogen EU) con sulfato de amonio sin aminoácidos en 1 L de agua desionizada. Se calentó la solución para disolver completamente las sales. La solución se esterilizó por filtración y se conservó a 4°C hasta su utilización.

**B 500X** (Biotina 0.02%): Se disolvió 20 mg de biotina en 100 mL de agua desionizada, se filtró por esterilización y se conservó a 4°C hasta su uso.

**H 100X** (Histidina 0.4%): Se disolvió 400 mg de L-histidina en 100 mL de agua desionizada, se calentó la solución a una temperatura no mayor de 50°C para disolver, se esterilizó por filtración y la solución se conservó a 4°C hasta su uso.

**D 10X** (Dextrosa 20%): Se disolvió 200 g de D-glucosa en 1 L de agua desionizada, posteriormente se esterilizó por autoclave 15 min a 121°C, 15 psi. La solución se dejó enfriar a temperatura ambiente y se conservó a 4°C hasta su uso.

**M 10X** (Metanol 5%): Se mezcló 5 mL de metanol con 95 mL de agua desionizada, la solución se filtró por esterilización y se conservó a 4°C hasta su uso.

**GY 10X** (Glicerol 10%): Se mezclaron 100 mL de glicerol con 900 mL de agua desionizada, se esterilizó por autoclave 15 min a 121°C, 15 psi. La solución se conservó a temperatura ambiente.

---

**AA 100X** (Aminoácidos 0.5% cada uno): Se disolvió 500 mg de cada uno de aminoácido (L-ácido glutámico, L-metionina, L-lisina, L-leucina y L-isoleucina) en 100 mL de agua desionizada. La solución se esterilizó por filtración y se conservó a 4°C hasta su uso.

**Buffer de fosfato de potasio 1 M, pH 6.0:** Se combinó 132 mL de  $K_2HPO_4$  1 M con 868 mL de  $KH_2PO_4$  y se confirmó el pH de 6.0, para ajustar el pH se utilizó ácido fosfórico. La solución se esterilizó por autoclave 15 min a 121°C, 15 psi y se conservó a temperatura ambiente hasta su uso.

Medio de cultivo para el crecimiento de células GS115 y KM71 no transformadas:

**Medio YPD:** Se disolvió 10 g de extracto de levadura y 20 g de peptona en 900 mL de agua desionizada, en el caso de placas de medio YPD sólido se adicionó 20 g de agar. Se esterilizó en autoclave por 15 min a 121°C, 15 psi. El medio se dejó enfriar a temperatura ambiente y se agregó 100 mL de dextrosa 10X y se conservó a 4°C hasta su uso.

Medio de cultivo para la extracción de ADN de células de *P. pastoris*:

**Medio RDB:** Se disolvió 186 g de sorbitol en 700 mL de agua desionizada con 20 g de agar. Se esterilizó en autoclave por 15 min a 121°C, 15 psi. La solución se dejó enfriar en un baño de agua a 60°C antes de la adición de la mezcla de stock de soluciones. Se preparó previamente una solución stock que contenía 100 mL de dextrosa 10X, 100 mL de YNB 10X, 2 mL de biotina 500X, 10 mL de aminoácidos (Glu, Ile, Leu, Lys y Met) 100X en 88 mL de agua desionizada, esta solución se mezcló con la solución de sorbitol. El medio se guardó a 4°C hasta su uso.

Medios de cultivo para el crecimiento hasta fase log de células de *P. pastoris*:

**Medio MGY:** Se esterilizó 800 mL de agua desionizada en autoclave por 15 min a 121°C, 15 psi. Posteriormente se dejó enfriar a temperatura ambiente y se agregó de manera aséptica 100 mL de base de nitrógeno de levaduras (YNB) 10X, 2 mL de 500X biotina y 100 mL de glicerol 10X. El medio se mantuvo a 4°C hasta su uso.

---

**Medio MD:** Se mezcló 10 g de agar en 700 mL de agua desionizada y se esterilizó en autoclave por 15 min a 121°C, 15 psi. La solución se dejó enfriar y se agregó un stock de solución que contenía 100 mL de YNB 10X, 2 mL de biotina 500X y 100 mL de dextrosa 10X.

Medios de cultivo para la inducción de células de *P. pastoris*:

**Medio MM:** Se esterilizó 800 mL de agua desionizada con 15 g de agar en autoclave por 15 min a 121°C, 15 psi. La solución se dejó enfriar hasta 60°C y se le agregó un stock de soluciones que contenía 100 mL de YNB 10X, 2 mL de biotina 500X y 100 mL de metanol 10X, el medio se vertió en cajas Petri inmediatamente después de mezclar las soluciones y una vez gelificado el medio, se conservaron a 4°C.

**Medio BMGY:** Se disolvió 10 g de extracto de levadura, 20 g de peptona en 700 mL de agua desionizada y se esterilizó en autoclave por 15 min a 121°C, 15 psi. La solución se dejó enfriar a temperatura ambiente y se agregó 100 mL de buffer de fosfato de potasio 1 M, pH 6.0, 100 mL de YNB 10X, 2 mL de biotina 500X y 100 mL de metanol 10X GY. El medio se conservó a 4°C hasta su uso.

#### 4.2.4 Amplificación por PRC de los genes JmCP

La PCR fue llevada a cabo mediante el procedimiento indicado por el fabricante utilizando la Polimerasa de ADN KOD Hot Star (Novegen, EU). Los genes JmCP4 y JmCP5 fueron amplificados a partir del vector pBSKII(-). La reacción de PCR se realizó con 5 µL de Buffer 10X de KOD, 1 µL del plásmido pBSKII-JmCP, 5 µL de dNTPs 2 mM para KOD, 5 µL del iniciador pPIC9 *Xho*IF (10 µM), 5 µL del iniciador pPIC9 *Not*I R (10 µM), 3 µL de MgSO<sub>4</sub> (25 mM), 32 µL de agua desionizada y 1 µL de KOD polimerasa. Los iniciadores utilizados en la reacción de PCR se muestran en la tabla 5. Las condiciones del termociclador para la amplificación de los genes JmCP fueron las siguientes: activación de la polimerasa 2 min a 95° C, se programaron 35 ciclos que incluyeron desnaturalización a 94°C por 20 s, alineación a 65°C por 10 s y extensión a 70° C durante 15 s; la

---

elongación final se realizó durante 2 min a 72°C. Se corrió 10 µL de la reacción de PCR en gel de agarosa al 0.8% para identificar los genes de interés. El fragmento de interés fue purificado de gel como se describe en la sección 4.3.4.

**Tabla 5.** Iniciadores usados en la amplificación de JmCP.

---

pPIC9 <i>XhoI</i> F	5' TCTCTCGAGAAAATTCTATTTGTTGGGGT 3'
pPIC9 <i>NotI</i> R	5' TGC GCGGCCGCTTTGGTAGGAAAGTA 3'

---

#### 4.2.5 Reacción simultánea de digestión y ligación en pBSKII

Se realizó la reacción de corte y ligación simultáneamente para ligar el producto de PCR previamente purificado con el plásmido pBSKII, para esto se utilizaron 6 µL del producto de PCR, 1 µL del plásmido pBSKII, 1 µL de la enzima de restricción *EcoRV* (Fermentas, CAN), 2 µL de buffer de ligasa T4 (Fermentas CAN), 1 µL de la enzima ligasa (Fermentas, CAN) y 9 µL de agua desionizada, la reacción se incubó durante 16 h a 4°C. Utilizando la reacción se transformaron células de *E. coli* DH5α electrocompetentes como se describe en la sección 4.1.8. Las células se sembraron por extensión con varilla en placas de medio LB con ampicilina y estas se incubaron a 37°C durante 16 h. A partir de una de las colonias crecidas se inoculó en 5 mL de medio LB líquido con ampicilina y se dejó crecer 16 h a 250 rpm y 37°C, a continuación se procedió a extraer el plásmido como se describe en la sección 4.3.2. La construcción pBSKII-JmCP se corroboró por digestión con las enzimas de restricción.

#### 4.2.6 Digestión con enzimas de restricción

La restricción del vector se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante utilizando 10 unidades de la enzima *XhoI* Fast Digest (Fermentas, CAN), 2 µL de vector pPIC9, 2 µL de buffer Fast Digest 10X y 15 µL de agua desionizada, la reacción se incubó a 37°C por 30 min, posteriormente se desactivó la enzima a 80°C durante 5 min. En la reacción anterior se añadió 0.2 µL de *NotI* y 2 µL de Buffer O, la reacción se incubó a 37°C por 12 h.



---

#### 4.2.7 Reacción de ligación en pPIC9

El vector de pPIC9 purificado por minipreparación (Sección 4.3.2) y el gen JmCP purificado por banda de gel de agarosa (Sección 4.3.5) fueron digeridos con las enzimas de restricción *NotI* y *XhoI* (Sección 4.2.6) y se ligaron para obtener la construcción del vector pPIC9JmCP. La reacción de ligación se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante y consistió en una reacción con 4  $\mu\text{L}$  del ADN del vector pPIC9, 7  $\mu\text{L}$  de ADN de JmCP, 2  $\mu\text{L}$  de buffer de ligasa, 1  $\mu\text{L}$  de ligasa (Fermentas, CAN) y 6  $\mu\text{L}$  de agua desionizada. La reacción se incubó toda la noche a 4°C. Transcurrido este tiempo se transformaron células *E. coli* DH5 $\alpha$  (Sección 4.1.8) y se realizó la minipreparación del plásmido construido (sección 4.3.2) a partir de cepas que crecieron en medio LB con ampicilina.

#### 4.2.8 Linealización y purificación del vector pPIC9JmCP

Para la linealización del vector pPIC9 se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante y se utilizó 1  $\mu\text{L}$  de la enzima *SalI* (Fermentas, CAN), 1  $\mu\text{L}$  de vector pPIC9, 2  $\mu\text{L}$  de buffer O 10X y 16  $\mu\text{L}$  de agua desionizada, la reacción se incubó a 37°C durante toda la noche, posteriormente se desactivó la enzima a 65°C durante 20 min. La linealización del vector se comprobó por electroforesis en gel de agarosa.

#### 4.2.9 Preparación de células electrocompetentes de *P. pastoris*

Se sembraron las cepas de *P. pastoris* GS115 y KM71 en placas con medio YPD, posteriormente se inoculó una colonia en 5 mL de medio YPD líquido estéril y el cultivo se incubó 16 h a 30°C. Posteriormente se inoculó 1 mL del medio de cultivo en un matraz de 250 mL con 50 mL de medio YPD estéril y se dejó crecer hasta una  $\text{DO}_{600}$  de 1.3-1.5. Las células se centrifugaron a 1500  $\times g$  por 5 min a 4°C, el pellet se resuspendió en 50 mL de agua desionizada fría estéril. Las células se centrifugaron nuevamente a 1500  $\times g$  y el pellet se resuspendió en 25 mL de agua desionizada fría estéril. Las células se centrifugaron nuevamente en las mismas condiciones y el pellet se resuspendió en 2 mL de sorbitol 1M frío. Se procedió a centrifugar por última ocasión el pellet celular y se resuspendió en 1 mL

---

de sorbitol 1 M frío, de las células contenidas en el volumen final se hicieron alícuotas de 80  $\mu$ L dentro de tubos de polipropileno de 1.5 mL limpios y estériles.

#### **4.2.10 Transformación de células de *P. pastoris***

Se mezclaron 80  $\mu$ L de células competentes con 5-20  $\mu$ g de DNA linealizado con *SalI* y se transfirieron a una celda de electroporación de 0.2 cm. Previamente la celda de electroporación se incubó en hielo durante 5 min. Para la transformación de levadura se utilizó un electroporador (BioRad, EU). Las condiciones utilizadas para la transformación de *P. pastoris* fueron 1500 V, 25  $\mu$ F, 200 $\Omega$  por 5 ms. Inmediatamente después de la electroporación se adicionó 1 mL de sorbitol 1M a la celda y se transfirió su contenido a un tubo estéril para microcentrífuga. Los tubos se incubaron por 30 min a 30°C. Después del periodo de incubación las células se sembraron por extensión con varilla en alícuotas de 200  $\mu$ L en placas con medio sólido de RBD y MD deficiente de His<sup>+</sup>. Las placas se incubaron por 1 día a 30°C hasta que aparecieron colonias en medio deficiente en His<sup>+</sup>.

#### **4.2.11 Extracción de ADN genómico de *P. pastoris***

Se inoculó una colonia recombinante en 10 mL de medio YPD y se dejaron crecer hasta una DO<sub>600</sub> de 5-10. Se adicionó 1 mL del cultivo de levaduras en un tubo de 1.5 mL y se centrifugó a 16 000x g por 2 min para obtener el pellet celular, posteriormente se removió el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 293  $\mu$ L de EDTA 50 mM, a cada tubo se le adicionó 1.5  $\mu$ L de zimolasa (3mg/mL) y se mezcló con la pipeta suavemente cuatro veces. La muestra se incubó a 37°C por 60 min para digerir la pared celular. Posteriormente la muestra se centrifugó a 16000 x g por 2 min y se removió el sobrenadante. Al pellet celular se le agregó 300  $\mu$ L de Solución de Lisis Nuclear (WizardGenomic DNA Purification Kit, Promega, EU) y se mezcló con la pipeta suavemente, se adicionó 100  $\mu$ L de Solución para precipitar proteína (WizardGenomic DNA Purification Kit, Promega, EU), la muestra se mezcló con vortex a máxima velocidad durante 20 s y se dejó la muestra en hielo por 5 min, posteriormente la muestra se centrifugó 16000 x g durante 3 min. Tiempo después se transfirió el sobrenadante a un tubo para centrifuga con 300  $\mu$ L de

---

isopropanol, la muestra se mezcló suavemente por inversión y se centrifugó a  $16000 \times g$  por 2 min. Cuidadosamente se decantó el sobrenadante y se dejó secar el tubo en papel absorbente, ya seco el tubo, se agregó 300  $\mu\text{L}$  de solución de etanol al 70% y se invirtió el tubo varias veces para lavar el pellet. Se centrifugó el tubo a  $16000 \times g$  por 2 min, se retiró cuidadosamente el etanol y se dejó secar el tubo en forma invertida sobre papel absorbente durante 15 min. Se agregó 50  $\mu\text{L}$  de Solución de Rehidratación de ADN (WizardGenomic DNA Purification Kit, Promega, EU) y se adicionó 1.5  $\mu\text{L}$  de Solución de RNAsa (WizardGenomic DNA Purification Kit, Promega, EU). La muestra se mezcló con vortex por 1 s, se centrifugó por 5 s para coleccionar el líquido y se incubó a  $37^{\circ}\text{C}$  por 15 min. Por último, la muestra se rehidrató por incubación a  $65^{\circ}\text{C}$  durante 1h con mezclado intermitente. Posteriormente se incubó la muestra a  $4^{\circ}\text{C}$  durante toda la noche para rehidratar la muestra y se incubó a  $4^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

#### **4.2.12 Análisis por PCR de cepas transformadas**

Utilizando el ADN genómico de *P. pastoris* se realizó el análisis de integración del vector con el inserto por PCR con 5  $\mu\text{L}$  de Buffer 10X PCR, 5  $\mu\text{L}$  de ADN genómico, 1  $\mu\text{L}$  de dNTPs 100 mM para Taq polimerasa, 5  $\mu\text{L}$  del primer 5'AOX (0.1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ), 5  $\mu\text{L}$  del primer 3'AOX (0.1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ), 28.75  $\mu\text{L}$  de agua desionizada estéril y 0.25  $\mu\text{L}$  de Taq polimerasa. Se utilizó como control positivo la construcción del vector pPIC9 con el inserto JmCP y como control negativo el ADN genómico de cepas sin transformar. Para la amplificación de la región del ADN genómico se emplearon los iniciadores 5'AOX y 3'AOX y la reacción se llevó a cabo en termociclador programado con las siguientes condiciones: calentamiento inicial de 2 min a  $94^{\circ}\text{C}$ , 30 ciclos que incluyeron desnaturalización a  $94^{\circ}\text{C}$  por 1min, alineación a  $55^{\circ}\text{C}$  por 1min, extensión a  $72^{\circ}\text{C}$  durante 1 min y para la extensión final  $72^{\circ}\text{C}$  durante 7 min. Se corrieron 10  $\mu\text{L}$  de la muestra en gel de agarosa al 0.8% para identificar los genes de interés. Los fragmentos de ADN que por análisis óptico mostraron la construcción correcta pPIC9JmCP fueron purificadas a partir de gel y se mandaron a analizar por secuenciación para corroborar la construcción.

---

#### **4.2.13 Fermentación de *P. pastoris* transformadas con pPIC9JmCP**

Se inoculó una colonia en 50 mL de medio BMGY en un matraz con deflectores de 500 mL hasta una OD<sub>600</sub> de 2-6 (aproximadamente de 16-18 h a 250 rpm). Las células se concentraron por centrifugación a 3000  $\times$  g por 5 min a temperatura ambiente. Para la inducción de la expresión se decantó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 50 mL de medio BMMY en matraces con deflectores de 250 mL, y se adicionó metanol al 100% a una concentración final de 0.5% (v/v) y se incubó a 30°C y 250 rpm y se agregó 0.5% de metanol cada 24 h para mantener la inducción durante 12 días. Cada 24 h se tomó un 1mL del cultivo y se centrifugó a máxima velocidad por 3 min a temperatura ambiente. Para la expresión de proteína extracelular, se transfirió el sobrenadante a un tubo para microcentrífuga y se conservó a -20°C hasta su análisis.

#### **4.2.14 Purificación de la proteína excretada**

Los cultivos de *P. pastoris* fueron centrifugados a 3000 rpm durante 5 min. La pastilla formada se desechó y se conservó el sobrenadante, el cual fue concentrado en celdas de ultrafiltración (AMICON ULTRA-4 4 mL 3 K, EU) por centrifugación a 6000 rpm durante 20 min.

#### **4.2.15 Proteína extracelular obtenida de *P. pastoris***

Durante la cinética de crecimiento de *P. pastoris* se tomaron muestras para el análisis en SDS-PAGE, para esto se tomó 1mL de muestra a diferentes tiempos y se colocaron en un tubo estéril de 1.5 mL. Las células se centrifugaron a 12000  $\times$  g por 5 min, posteriormente se desechó la pastilla y se recuperó el sobrenadante. La proteína del sobrenadante fue concentrada en celdas de ultrafiltración (AMICON ULTRA-4 4 mL 3 K, EU) por centrifugación a 6000 rpm durante 20 min. Posteriormente se tomó 5  $\mu$ L de muestra y se mezcló con 20  $\mu$ L de buffer de carga 4X seguida de un calentamiento a 90°C por 5 min. La muestra fue analizada de acuerdo al protocolo de la sección 4.4.2.

---

## 4.3 Análisis de ADN

### 4.3.1 Minipreparación de ADN plasmídico por lisis alcalina

La minipreparación de ADN plasmídico de *E. coli* fue llevada a cabo de acuerdo al protocolo de Sambrook y Rusell (2001). En un tubo de vidrio de 25 mL con 5 mL de medio LB y con el antibiótico apropiado se inoculó una colonia bacteriana transformada (TOP10F' o DH5 $\alpha$ ) de una placa de medio LB que fue incubada por 20h a 37°C y se transfirió a 100mL de medio LB líquido. Posteriormente, se transfirió 1.0 mL de cultivo a un tubo y se centrifugó a máxima velocidad por 30s a 4°C. El sobrenadante fue retirado y la pastilla formada fue resuspendida en 200 $\mu$ L de solución de lisis alcalina I fría (50mM de glucosa, 25 mM de Tris-HCl pH 8.0, 10 mM de EDTA, la solución preparada se esteriliza en autoclave por 15 min a 121°C, 15 psi y se conserva a 4°C), se homogenizó en vortex. Se agregó 200  $\mu$ L de solución de lisis alcalina II recién preparada (0.2 N de NaOH recién preparado, 1% (w/v) de SDS, se conservó a temperatura ambiente), se mezcló invirtiendo el tubo de 5 veces y se mantuvieron en hielo. Seguido a esto se agregó 150  $\mu$ L de solución de lisis alcalina III (60 mL de acetato de potasio 5M, 11.5 mL de ácido acético glacial y 28.5mL de agua desionizada estéril, la solución se conservó a 4°C), se mezcló y se incubó en hielo 5 min. Después del tiempo de incubación, las muestras se centrifugaron a máxima velocidad por 5 min a 4°C. El sobrenadante fue transferido a un tubo limpio y para precipitar los ácidos nucleicos se adicionaron dos volúmenes de etanol al 100%, se mezcló en vórtex y se dejó incubar por 2 min. Para precipitar los ácidos nucleicos se centrifugó a máxima velocidad por 5 min a 4°C y se descartó el sobrenadante. Por último, se adicionó 1mL de etanol al 70% (v/v) y se centrifugó a máxima velocidad por 2 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla por 20 min, la cual fue resuspendida en 50 $\mu$ L de agua desionizada estéril (Sambrook y Russell, 2001).

### 4.3.2 Minipreparación de ADN plasmídico utilizando kit

La minipreparación de ADN plasmídico se realizó con el Kit de purificación para minipreparaciones de ADN (Promega, EU). Un cultivo de 5 mL crecido toda la noche en medio LB se centrifugó a máxima velocidad para obtener la pastilla celular. La pastilla se

---

mezcló en 250  $\mu\text{L}$  de Solución de resuspensión celular y se mezcló vigorosamente. Posteriormente se agregaron 10  $\mu\text{L}$  de la Solución de proteasa alcalinay se mezcló por inversión cuatro veces. Esta mezcla se incubó durante 5 min a temperatura ambiente, y se centrifugó a máxima velocidad por 10 min a temperatura ambiente. La mezcla se depositó en una columna de purificación de ADN ensamblada dentro de un tubo colector. Se centrifugó a máxima velocidad durante 1 min a temperatura ambiente, el filtrado se eliminó y se reinsertó la columna dentro del tubo colector. Se continuó con el lavado adicionando 750  $\mu\text{L}$  de la Solución de lavado, se centrifugó a máxima velocidad durante 1 min, se descartó el filtrado y se reinsertó la columna en el tubo colector, se repitió este último paso con 250  $\mu\text{L}$  de la Solución de lavado centrifugando a máxima velocidad por 2 min a temperatura ambiente, se descartó el filtrado y se centrifugó 1 min adicional. La columna se transfirió a un tubo de 1.5 mL estéril, se adicionó 100  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas y se dejó reposar 1 min a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó a máxima velocidad durante 1 min. Se descartó la columna y se guardó el ADN a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

### **4.3.3 Electroforesis de ADN en geles de agarosa**

La electroforesis en gel de agarosa fue llevada a cabo como se describe por Sambrook y Russell (2001). Para preparar un gel, se pesó 1g de agarosa, se disolvió en 100mL de TBE 0.5X y se fundió en horno de microondas, esta última solución se preparó a partir de una solución stock TBE 5X (54g de Tris base, 27.5 g de ácido bórico y 20 mL de EDTA 0.5M pH 8.0 aforando a 1L con agua desionizada). A la solución de agarosa se le adicionó Rojo Texas (Biotium, EU) y se colocó en un molde de cámara de electroforesis. Se mezcló 1 $\mu\text{L}$  de DNA con buffer de carga 6X (Tris-HCl 10 mM pH 7.6, azul de bromofenol al 0.03% w/v, xileno cianol FF al 0.03%, glicerol al 60% v/v, EDTA 60mM). La mezcla fue cargada en los pozos del gel. Las condiciones durante la electroforesis fueron de 90 mV durante 1 h (Sambrook y Russell, 2001). El DNA fue visualizado en un transiluminador KODAC GEL LOGIC 440 ImaginigSystem (EASTMAN KODAK, USA) usando luz UV y las fotografías se analizaron con el software KODAK 440 ImageAcquire (EASTMAN KODAK, EU).

---

#### **4.3.4 Determinación de la concentración de ADN**

Para determinar la concentración de ADN por gel de electroforesis, las muestras se corrieron en gel de agarosa junto con un marcador de ADN cuantitativo (Quick-Load, DNA Ladder, BioLabs, UK). La concentración fue analizado con la cantidad conocida presente en el marcado de ADN utilizando el paquete informático KODAK MI<sup>TM</sup>, EU.

#### **4.3.5 Purificación de ADN a partir de geles de agarosa y reacciones de PCR**

La purificación de ADN a partir de geles de agarosa y de reacciones de PCR se llevó a cabo utilizando el Kit de purificación de bandas de geles y reacciones de PCR (Promega, EU). El procedimiento consistió en el corte de la banda del gel con el fragmento de ADN de interés, posteriormente la banda de gel se disolvió en la Solución de unión a membrana en una proporción de 10 µL por cada 10 mg de agarosa. En el caso de reacciones de PCR se mezcló un volumen en relación 1:1. Para ambos procesos se mezcló gentilmente la muestra y se incubó a 60°C por 10 min hasta que el gel estuvo completamente disuelto. La mezcla se transfirió a una columna para purificación de ADN ensamblada en un tubo colector y se incubó durante 1 min a temperatura ambiente. La columna se centrifugó a 16000 x g durante 1 min. La columna se removió y se descartó el líquido del tubo colector y nuevamente se retornó la columna dentro del tubo colector. La columna se lavó con 700 µL de la solución de lavado y después se centrifugó 1 min a 16000 x g. El tubo colector fue vaciado nuevamente y se retornó la columna dentro del tubo colector para repetir el lavado con 500 µL de la solución de lavado. La muestra se centrifugó a 16000 x g durante 5 min, se vació el tubo colector y se centrifugó por un minuto adicional. La columna se transfirió a un tubo de polipropileno de 1.5 mL estéril, a la columna se le adicionó 50 µL de agua desionizada, se incubó a temperatura ambiente durante 1 min y se centrifugó a 16000 x g durante 1 min, seguido de esto se descartó la columna y se guardó el filtrado a -20°C.

---

#### 4.3.6 Secuenciación de ADN

La secuenciación de ADN fue llevada a cabo por Macrogen Inc, Seoul, Korea. El producto de secuenciación fue analizado por el paquete informático CodonCode Aligner 4.0.3, LICOR Inc, EU. En la tabla 6 se muestran los iniciadores utilizados para este análisis.

**Tabla 6.** Iniciadores usados en la secuenciación de JmCP.

<i>E. coli</i>	T7 F	5'TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG3'
	T7 R	5'GCT AGT TAT TGC TCA GCG G 3'
<i>P. pastoris</i>	5'AOX1	5' GAC TGG TTC CAA TTG ACA AGC 3'
	3'AOX1	5'GCA AAT GGC ATT CTG ACA TCC3'

#### 4.4 Análisis de la expresión de las proteasas recombinantes

##### 4.4.1 Determinación de la concentración de proteína

La determinación de la cantidad de proteína se realizó siguiendo las indicaciones del fabricante para el protocolo de ensayo en placa de 96 pozos (Reactivo de Bradford, Sigma, EU). El reactivo de Bradford se mezcló gentilmente en el bote y se mantuvo a temperatura ambiente. Se preparó una curva de proteína estándar de BSA (0.1-1.4 mg/mL) en PBS ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.7 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  5.2 mM y NaCl 150 mM). Se colocaron 5  $\mu\text{L}$  de la muestra de BSA de concentración conocida en diferentes pozos, para el blanco se adicionó 5  $\mu\text{L}$  de PBS, y en cada pozo se adicionaron 250  $\mu\text{L}$  del Reactivo de Bradford. Las muestras se mezclaron por agitación 30 s, y se incubaron por 5 min a temperatura ambiente, entonces se midió la absorbancia a 595 nm en un lector de placas (Multiskan Ex Microplate Photometer, Thermo Scientific, EU). Se realizó una gráfica de la concentración absorbancia contra la concentración de proteína para la curva estándar. Las muestras de concentración de proteína desconocida fueron analizadas colocando 5  $\mu\text{L}$  en cada pozo en una concentración entre 0.1-1.4 mg/mL, para cada muestra se adicionó 250  $\mu\text{L}$  de Reactivo de Bradford, se incubaron a temperatura ambiente durante 5 min y se leyó su absorbancia a 595 nm. Para determinar la concentración de proteína se comparó el valor de la absorbancia contra la curva estándar.



---

#### 4.4.2 SDS-PAGE

Se siguió el protocolo reportado por Laemmli et al., 1970. Se prepararon los buffers Ax2, Bx2, solución de APS, buffer de carga de proteínas y buffer Laemmli 10X. Para el buffer Ax2 se utilizaron 90.6g de Tris (Trizma base, 0.75M) y 2.0g de SDS aforando a 1L con agua desionizada ajustando el pH a 8.8 con HCl; mientras que para el buffer Bx2 se utilizaron 30.24g de Tris (Trizma base, 0.25M), 2.0g de SDS y se aforó a 1L con agua desionizada ajustando el pH a 6.8 con HCl. El buffer de carga de proteínas se preparó con 3.8mL de agua desionizada estéril, 1mL de 0.5M Tris-HCl pH 6.8, 0.8 mL de glicerol, 1.6mL de SDS 10%, 0.4mL de 2-β-mercaptoetanol y 0.05% de azul de bromofenol. La solución de APS se preparó al momento de utilizarse empleando 100mg de SDS (persulfato de amonio) en 1mL de agua desionizada estéril. La solución 0.5 M Tris-HCl del buffer de carga se preparó empleando 60.55g de Trizma base en 400mL de agua desionizada, se ajustó el pH a 8.8 con HCl y se aforó a 500mL. En el buffer Laemmli 10 X se usaron 30.3g de Tris, 144g de glicina y 10 g de SDS, se llevó a un litro con agua desionizada, esta solución fue esterilizada en autoclave por 15 min a 121°C y 15 psi. Se ensambló el dispositivo (BioRad, EU) para cargar los geles y entre las placas de vidrio se vertió el gel de resolución (para dos geles de acrilamida al 12% se utilizó 1.4mL de agua desionizada estéril, 7.5mL de solución Ax2, 4.5mL de acrilamida al 40%, 75μL de solución de APS, y 7.5 μL de TEMED) hasta un nivel de 1cm por debajo de la altura de los dientes de los peines. Se agregó agua desionizada para permitir que la formación de una línea horizontal, una vez polimerizado el gel, se retiró el agua con papel filtro, posteriormente se agregó el gel concentrador (para esta solución se utilizó 1.64mL de agua desionizada estéril, 7.5mL de solución Bx2 (buffer del gel concentración), 618μL de acrilamida al 40%, 30μL de solución de APS, y 5 μL de TEMED, se colocó el peine y se dejó polimerizar durante 20min. Después se retiró el peine, se limpiaron los pozos con papel filtro y se colocaron 16μL de la muestra de proteínas preparada (10μL de muestra y 10 μL de regulador de muestra). Las muestras se corrieron a 70mV durante la etapa de concentración y a 90mV durante la etapa de separación (durante 20 min y 2h, respectivamente) utilizando un buffer Laemmli 1X. Posteriormente los geles se transfirieron a recipientes con solución teñidora (0.5g de Azul de Commassie en 500 mL de solución desteñidora) cubriendo completamente

---

el gel y dejándolos teñir durante toda la noche, posteriormente se realizaron dos lavados con solución desteñidora (400mL de metanol, 100mL de ácido acético y 500mL de agua desionizada) cada lavado de dos horas. Una vez desteñido los geles se procedió a tomar fotografía con escáner (Image Scanner, Amersham Biosciences, EU).

#### **4.4.3 Transferencia de proteínas**

La transferencia de proteína se realizó colocando las fibras Scotch y papeles Whatman (0.16mm) en un recipiente con amortiguador de transferencia durante 30 min. Se cortó la membrana de nitrocelulosa de acuerdo al tamaño del gel y se colocó en otro recipiente con amortiguador de transferencia. Se colocaron las dos fibras Scotch en un cassette para electrotransferencia sobre las cuales se colocaron las dos porciones de papel filtro teniendo cuidado de que no quedaran burbujas atrapadas entre los papeles; después se colocó el gel, y sobre este la membrana de nitrocelulosa. Se realizó una marca para marcar el frente del gel de electroforesis sobre el papel de nitrocelulosa. Se cerró el cassette y se insertó en el contenedor. Se colocó el contenedor en la cámara y se llenó con amortiguador de transferencia (5.82g de Tris base, 2.93 g de glicina y 0.735g de SDS en 700mL de agua desionizada, se agregó 200mL de metanol y se ajustó el volumen a 1 L), se tapó y se conectaron los electrodos de tal manera que el ánodo quedó del lado del gel y el cátodo del lado de la membrana de nitrocelulosa. Se conectó la fuente de poder y se transfirió durante 1h a 100V, evitando que la temperatura del líquido fuera mayor de 60°C. Al terminar la transferencia se tomó la membrana de nitrocelulosa con guantes y se colocó en un recipiente con solución de Rojo Ponceau (200mg de rojo Ponceau y se añadió 3g de ácido tricloroacético, esta solución se aforó a 100mL con agua desionizada y se mantuvo a 4°C en un frasco ámbar) y se dejó teñir durante 20 min. Se observó la membrana para distinguir la transferencia de proteínas al lavar la membrana con agua desionizada para retirar el exceso de colorante y se procedió al tratamiento para Western blot (Sambrook y Russell, 2001).

#### **4.4.4 Western blot**

---

Se utilizó la membrana de la transferencia de proteínas y se colocó en un recipiente con amortiguador de bloqueo (5g de leche descremada en polvo y se disolvió en 100 mL de PBS-Tween 20, conservada a -20°C hasta su uso; la solución PBS 10X se preparó midiendo 800mL de agua desionizada y se agregó 100mL de PBS 10X y 8.75g de NaCl), incubando durante 2h a temperatura ambiente con agitación continua. Se disolvieron las sales y se ajustó el pH a 7.2. Se aforó a 1L con agua desionizada. Se eliminó el exceso de la solución de bloqueo por decantación y se realizaron 2 lavados con PBS-Tween-leche descremada por un periodo de 5 min cada lavado en agitación continua. Se incubó la membrana con el anticuerpo anti-mexicana en dilución 1:1000. Se eliminó el exceso y se realizaron 2 lavados de 5 min con PBS-Tween (a 1 L de PBS a pH 7.2 se le añadió 500µL de Tween20). Posteriormente se agregó el conjugado (anticuerpo de conejo IgG producido en cabra y acoplado a peroxidasa) correspondiente en dilución 1: 1000 con PBS-Tween. Se incubó durante 2h a temperatura ambiente con agitación continua. Se eliminó el exceso y se realizaron 2 lavados de 5 min con PBS-Tween. Por último se agregó la solución sustrato cromogénico (25mg de 4-clor-1-naftol, se añadió 5 mL de metanol absoluto y 25 mL de PBS, se adicionó 25µL de peróxido de hidrógeno al 3% v/v, la solución se preparó inmediatamente antes de usarla) y se mantuvo hasta la presencia de bandas de color café (aprox. 10-20); después se enjuagó la membrana con agua desionizada y se dejó secar la membrana.

#### **4.4.5 Zimograma**

El protocolo se llevó a cabo por el método modificado de Hadj et al., 2011. Se prepararon geles de poliacrilamida al 10% copolimerizado con gelatina 0.1% como sustrato; las condiciones de corrida fueron las reportadas por Laemmli 1970, con la modificación de que no se utilizaron agentes reductores como ( $\beta$ -mercaptoetanol) y las proteínas no se calentaron antes de ser cargadas en el gel. Después de la separación electroforética, los geles fueron lavados por 1 h en agitación constante con Tritón X-100 al 2.5%, después de ser lavados se incubaron a 36°C por 16 h en regulador de fosfatos pH 7.6. La actividad proteolítica se reveló al teñir con azul de Coomassie G-250, las bandas blancas indicaron la existencia de proteínas con actividad enzimática.

---

#### 4.4.6 Prueba de actividad enzimática con un sustrato sintético

Para realizar los estudios de actividad enzimática de las proteasas recombinantes sobre el sustrato sintético N- $\alpha$ -Benzoil-DL-arginina 4-*p*-nitroanilida (BAPNA) se utilizó el método modificado de Dubois, et al. 1989. Se preparó una solución de sustrato que contenía de BAPNA 5 mM, en dimetilsulfóxido (10% v/v) y regulador de fosfatos 0.1 M, con Cis 25 mM y EDTA 25 mM a pH 7.0. Para iniciar la reacción se adicionaron en placas de 96 pozos el sustrato 80  $\mu$ L del sustrato y 20  $\mu$ L de la solución de la proteasa recombinante. Esta solución se incubó durante 10 minutos a 37°C. La actividad enzimática se expresó como moles de sustrato transformados (MST) por min y por mg de enzima. Se utilizaron las ecuaciones 1 y 2 para obtener las unidades de actividad enzimática.

$$\frac{A_{410}}{8800} = M \quad (1)$$

$$\frac{MST * V}{t * E} = \text{Actividad específica p} \quad (2)$$

donde:

A<sub>410</sub>: Absorbancia a 410 nm

V: Volumen de reacción (0.1 mL)

8800: Coeficiente de absorción a 410 nm

t: Tiempo (min)

E: Concentración de enzima( $\mu$ g/mL)

M: Moles de sustrato transformado por min por  $\mu$ g de enzima

## 5. Expresión de JmCP en *E. coli*

---

La producción de proteínas recombinantes se realiza preferentemente en el sistema de expresión procarionte *E. coli*. A pesar de que hay pocos estudios referentes a la expresión de enzimas proteolíticas de plantas, se ha demostrado la producción y obtención de forma activa de estas enzimas. Debido a lo anterior, con el objetivo de expresar las proteasas cisteínicas de *J. mexicana*, y utilizando las secuencias de ADNc, se diseñó una estrategia para la producción de estas enzimas de manera recombinante que consistió en el diseño de vectores, la comprobación de la integración, los niveles de producción de la enzima recombinante, su identificación inmunoenzimática y la determinación de su actividad proteolítica.

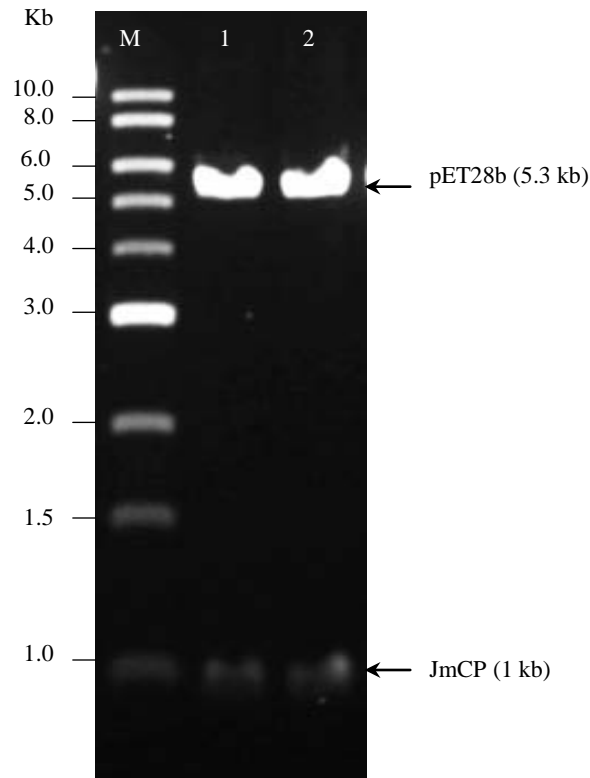
La producción de proteínas recombinantes se realiza preferentemente en el sistema de expresión procarionte *E. coli*. A pesar de que hay pocos estudios referentes a la expresión de enzimas proteolíticas de plantas, se ha demostrado la producción y obtención de forma activa de estas enzimas en *E. coli*. Dado lo anterior, con el objetivo de la expresión de genes proteasas cisteínicas de *J. mexicana* previamente aislados por el grupo de trabajo, la estrategia de trabajo consistió en el diseño de vectores, la comprobación de la integración de gen en el vector, evaluación de los niveles de producción de la enzima recombinante, su identificación por western blot y la determinación de su actividad proteolítica con un sustrato sintético y por medio de un zimograma.

### **5.1 Construcción de pET28bJmCP para la transformación de *E. coli***

Para investigar la expresión del gen de JmCP en *E. coli* fue construido el vector de expresión pET28bJmCP usando como base el vector de transformación pET28b. La construcción del vector pET28bJmCP se realizó introduciendo la secuencia cada gen para una proteasa cisteínica de *J. mexicana* (JmCP4 y JmCP5) en el sitio *Bam*HI flanqueado por las secuencias del promotor T7 y una cola His, siguiendo la metodología descrita en la sección 4.1.4. Para confirmar dicha construcción se realizó el análisis por digestión enzimática. En el análisis por digestión de los plásmidos construidos pET28bJmCP4 y pET28bJmCP5, como se observa en la Fig. 7, se muestran dos bandas de la reacción de digestión; una banda corresponde al vector pET28b (~5.3 kb), y otra banda que

---

corresponde al gen de la proteasas JmCP (~1 kb), confirmando la integración del gen JmCP en el vector de expresión vector pET28b. La construcción de los vectores de expresión pET28bJmCP, así como la alineación correcta del gen se comprobó mediante secuenciación, como se describe en la sección 4.3.6. Los resultados de secuenciación fueron comparados con las secuencias de JmCP4 y JmCP5, mostrando identidad de los nucleótidos de los genes para la proteína de *J. mexicana*.



**Fig. 7.** Electroforesis en gel de agarosa de la digestión de pET28bJmCP4 y pET28bJmCP5. Reacciones de digestión con *Bam*HI de los vectores pET28bJmCP4 y pET28bJmCP5 separadas por electroforesis en gel de agarosa 1%. Carril M) Marcador de peso; Carril 1) pET28bJmCP4 digerido con *Bam*HI; Carril 2) pET28bJmCP5 digerido con *Bam*HI.

Una vez confirmada la construcción, se realizó la transformación de células de *E. coli* BL21star (DE3) como se describe en la sección 4.1.8. La selección de colonias

---

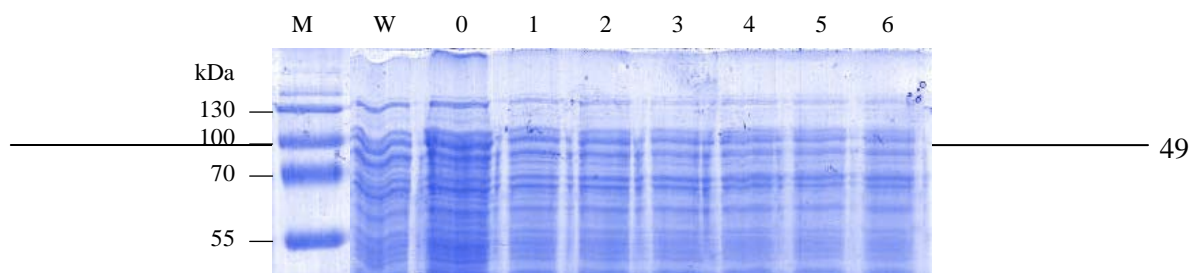
transformadas con el plásmido pET28bJmCP se llevó a cabo mediante el crecimiento en medio selectivo (LB suplementado con kanamicina 50 mg/L), crecidas en placa durante 16 h después de su transformación.

## 5.2 Expresión de JmCP en *E. coli*

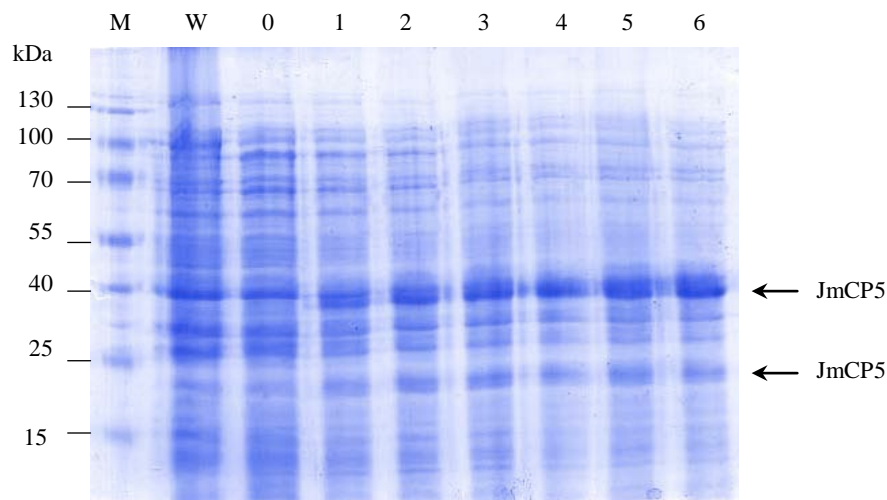
Para verificar la expresión de JmCP en *E. coli* BL21 transformada con el vector pET28bJmCP, se siguió la metodología de la sección 4.1.9. Para monitorear la expresión de JmCP, se mantuvo un cultivo en lote durante 6h post-inducción y se tomó 1 mL de muestra a intervalos de 1 h, la cual fue centrifugada para colectar la pastilla celular antes de la inducción y después de la inducción. La pastilla bacteriana fue tratada de acuerdo a la metodología descrita en la sección 4.1.14. En las Fig. 8 y 9 se muestran las muestras de los cultivos de cepas *E. coli* BL21 transformadas con los vectores pET28bJmCP4 y pET28bJmCP5, colectadas a intervalos de 1 h y analizadas por SDS-PAGE (Sección 4.4.2), y se observa un incremento en la intensidad de una banda teñida con Coomassie de aparentemente una masa molecular de 40 kDa, esta banda coincide con el tamaño esperado de las proteinasas JmCP4 y JmCP5 con la adición de una cola de His.

A lo largo de los cambios de intensidad se puede apreciar una banda de menor peso molecular, aproximadamente de 24 kDa, la cual pudiera representar a una proteína de JmCP madura para ambos casos de los genes. La mayor expresión se obtuvo con el plásmido que contiene el gen JmCP4 lo cual pudiera deberse a que esta construcción incluye péptido señal, mientras que JmCP5 no contiene el péptido señal.

En las Fig 8 y 9 también es posible apreciar que el tiempo óptimo de producción de las proteinasas JmCP fue de 4 h post-inducción con IPTG. En el caso de las células *E. coli* BL21 no transformadas (W) a las 6 h post-inducción no es posible observar el cambio de intensidad de las bandas señaladas para el caso de las cepas transformadas.



**Fig. 8.** Expresión de la proteína recombinante JmCP4 en *E. coli* BL21. Electroforesis en gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE) a 90 mV por 2.5 h. Carril M) Marcador de peso; Carril W) *E. coli* BL21 sin transformar al tiempo 6 h post-inducción; Carriles 0-6) *E. coli* BL21 transformada con pET28JmCP4 al tiempo 0, 1, 2, 3, 4, 5 y 6 h después de su inducción con IPTG.



**Fig. 9.** Expresión de la proteína recombinante JmCP5 en *E. coli* BL21. Electroforesis en gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE) a 90 mV por 2.5 h. Carril M) Marcador de peso; Carril W) *E. coli* BL21 sin transformar al tiempo 6 h post-inducción; Carriles 0-6) Proteína total de *E. coli* BL21 transformada con pET28JmCP5 tomada al tiempo 0, 1, 2, 3, 4, 5 y 6 h después de su inducción con IPTG.

### 5.3 Purificación y activación de la proteína JmCP de *E. coli*

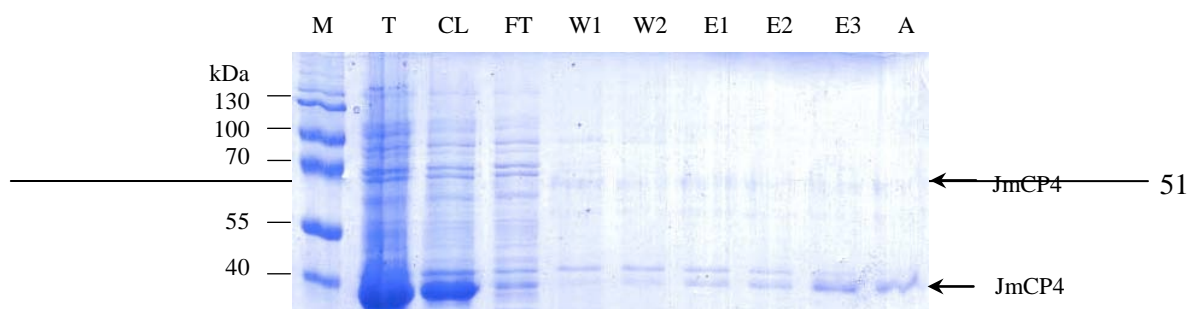


---

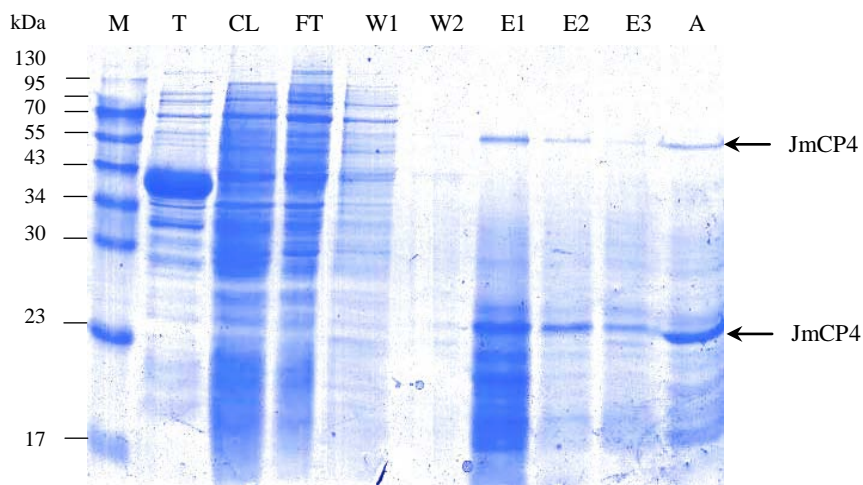
La purificación de JmCP expresada en los cultivos de *E. coli* BL21 se realizó utilizando cromatografía de afinidad (NTA-Ni), permitiendo la separación de proteínas que contenían la cola de His, para esto se siguió la metodología de la Sección 4.1.12, se realizó la activación de la proteasas se realizó de acuerdo a Sección 4.1.13 y las muestras fueron separadas en gel de poliacrilamida (Sección 4.4.2).

Para la purificación de las proteasas se probó la obtención de la proteína utilizando condiciones desnaturalizantes (con soluciones de urea y cambios de pH). En las Fig. 10 y 12 no se detecta la proteínasa en el filtrado sugiriendo que la mayor parte de JmCP se encontraba en la matriz NTA-Ni, durante etapa de lavado (W) no fue removida la proteína JmCP, y las fracciones de elución (E1, E2 y E3) contienen monómeros y dímeros de la proteína JmCP4 y JmCP5 removida. Se observa la recuperación de la fracción insoluble de la JmCP que cuenta con la cola de His, la proteína corresponde a 40 kDa. Además, bajo estas condiciones es posible observar bandas de ~ 70 kDa que pueden corresponder a dímeros de la proteína purificada u otra isoforma de la proteínasa JmCP. Bajo este protocolo, no fue posible lograr su activación en pruebas de actividad que se describen más adelante, es por eso que se eligió el protocolo de condiciones nativas para la recuperación de la proteasa recombinante.

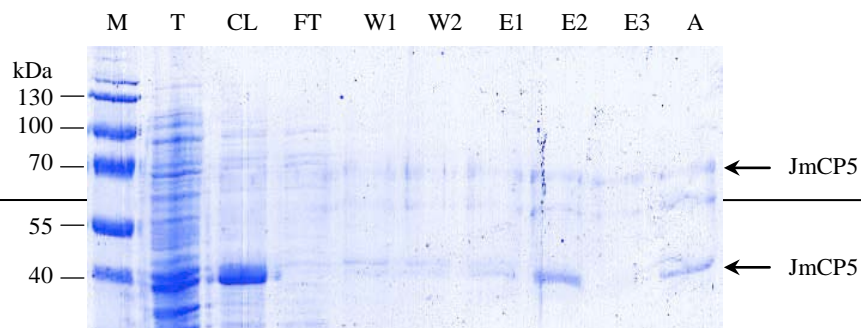
Para la purificación de la proteasa JmCP bajo condiciones nativas (soluciones de imidazol conservando pH 8.0) se obtuvo la fracción soluble de las proteasas recombinantes. Aunque no fue posible recuperar en su mayoría a la proteasa recombinante, fue posible identificar dos bandas de aprox. 24 y 72 kDa, como se puede apreciar en las Fig. 11 y 13. Como se puede apreciar el resultado de la purificación de la proteína de la disgregación parcial de cuerpos de inclusión y del replegamiento de JmCP implicó la presencia de monómeros aproximadamente 24 kDa y tetrámeros de ~72 kDa, la primera correspondiendo al tamaño esperado de la proteína madura de JmCP, siendo el resultado de la autocatálisis que consistió en la separación de las regiones de pro-péptido y péptido señal; mientras la segunda se pudiera explicar por la formación de agregados.



**Fig. 10.** Purificación de JmCP4 en columna Ni-NTA bajo condiciones desnaturalizantes. Electroforesis en gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE) con tinción azul de Comassie. M) Marcador de peso; T) proteína total después de 6 h ser inducida; CL) clarificado; F) filtrado; W1) primer lavado; W2) segundo lavado; E1) primera elución; E2) segunda elución; E3) tercera elución; A) proteína plegada y activa.

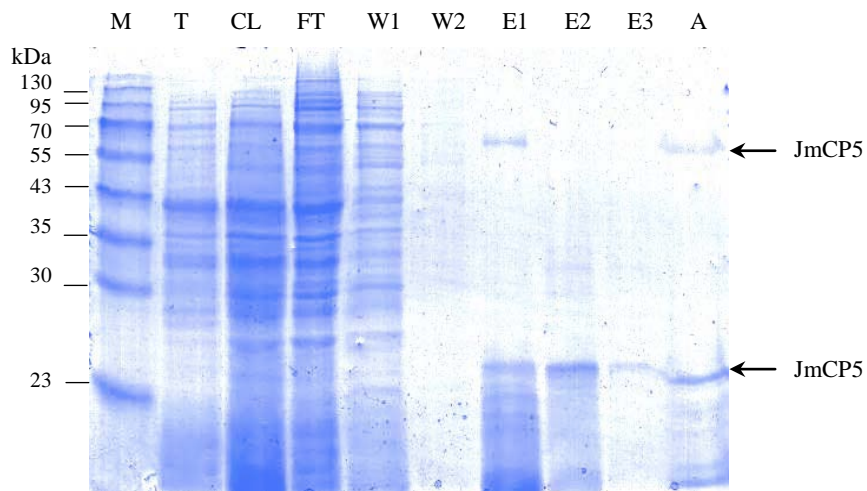


**Fig. 11.** Purificación de JmCP4 en columna Ni-NTA bajo condiciones nativas. Electroforesis en gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE) con tinción azul de Comassie. M) Marcador de peso; T) proteína total después de 6 h ser inducida; CL) clarificado; F) filtrado; W1) primer lavado; W2) segundo lavado; E1) primera elución; E2) segunda elución; E3) tercera elución; A) proteína plegada y activa.



---

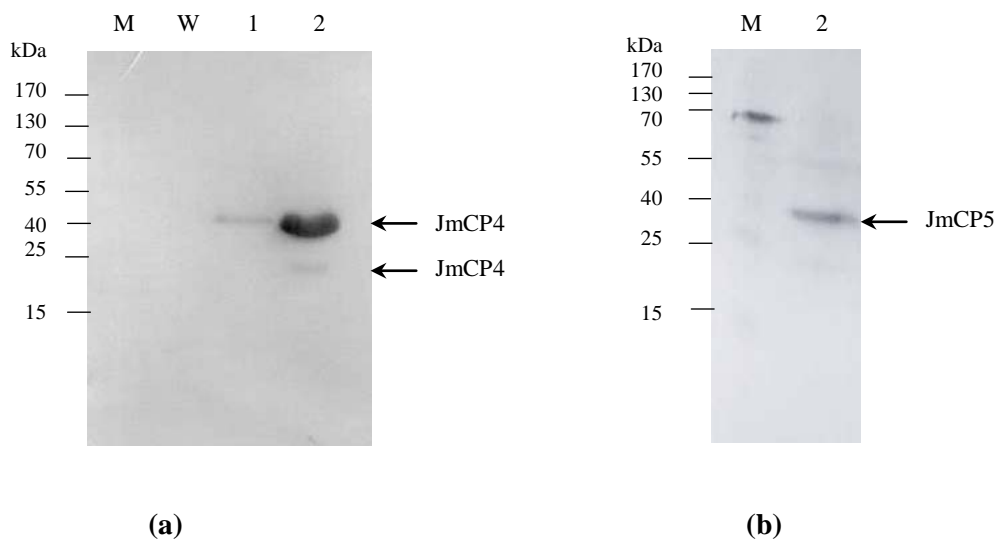
**Fig. 12.** Purificación de JmCP5 en columna Ni-NTA bajo condiciones desnaturalizantes. Electroforesis en gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE) con tinción azul de Comassie. M) Marcador de peso; P) pastilla celular después de 6 h ser inducida; CL) clarificado; F) filtrado; W1) primer lavado; W2) segundo lavado; E1) primera elución; E2) segunda elución; E3) tercera elución; A) proteína plegada y activa.



**Fig. 13.** Purificación de JmCP5 en columna Ni-NTA bajo condiciones nativas. Electroforesis en gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE) con tinción azul de Comassie. M) Marcador de peso; P) pastilla celular después de 6 h ser inducida; CL) clarificado; F) filtrado; W1) primer lavado; W2) segundo lavado; E1) primera elución; E2) segunda elución; E3) tercera elución; A) proteína plegada y activa.

#### 5.4 Identificación inmunoenzimática de la proteína JmCP

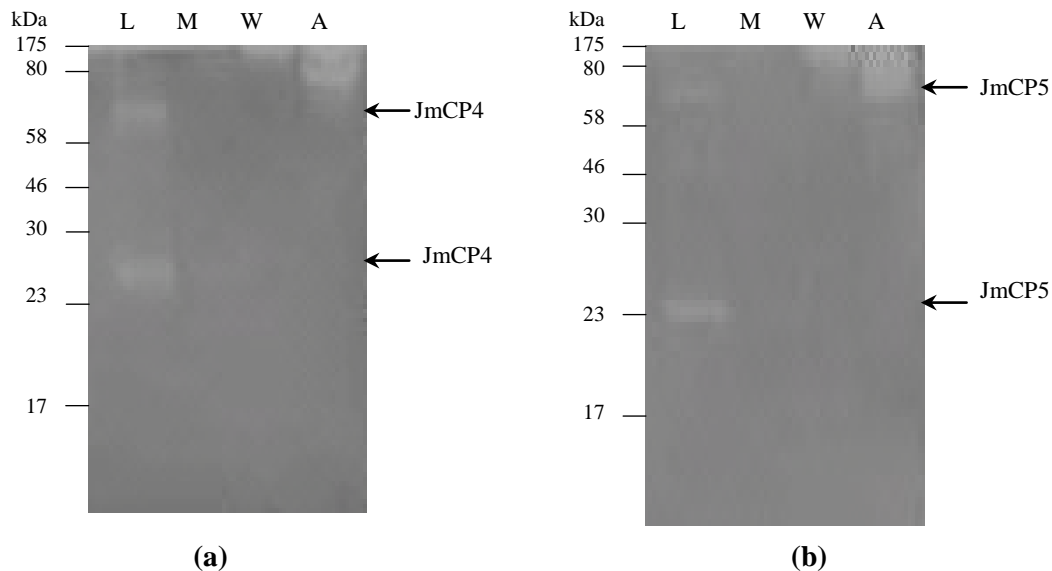
La identificación de las proteasas recombinantes de *J. mexicana* se hizo por medio de western blot utilizando anticuerpos policlonales anti-mexicana, para lo cual las muestras fueron separadas por SDS-PAGE (Sección 4.4.2), transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Sección 4.4.3) y se realizó la inmunodetección (Sección 4.4.4). Los resultados de dicho análisis se muestran en la Fig. 14 donde se observa una banda de aproximadamente 40 kDa la cual corresponde al peso molecular proteínasa recombinante que fue reconocida por los anticuerpos policlonales (a) pre-pro-enzima JmCP4 y (b) pro-enzima JmCP5 de aproximadamente 36 kDa. Además, se observa que las proteínas de *E. coli* BL21 no transformadas (W) no son reconocidas por los anticuerpos anti-mexicana. En la Fig. 14 (a) se observa una banda correspondiente a una proteína de menor peso molecular que fue reconocida por los anticuerpos, esta banda podría ser producto de degradación de la proteína de 40 kDa, o bien, a la identificación de la forma madura de JmCP. La detección de las proteasas cisteínicas de látex se detectaron como agregados que no corrieron en el gel (resultado no mostrado).



**Fig. 14.** Western blot de las proteínas recombinantes JmCP producidas en *E. coli* BL21. Veinte microlitros de las muestras analizadas en gel teñido con azul de Coomassie, fueron separadas por SDS-PAGE 12% y electrotransferidas a una membrana de nitrocelulosa. Carril M) Marcador de peso; Carril W) *E. coli* BL21 sin transformar al tiempo 6 h post-inducción; Carril 1) *E. coli* BL21 transformada al tiempo 6 h sin ser inducida; Carril 2) *E. coli* BL21 transformada e inducida para (a) JmCP4 y (b) JmCP5.

## 5.5 Análisis de la actividad proteolítica por zimografía

Para determinar la actividad proteolítica de las proteínas JmCP4 y JmCP5 purificadas, plegadas y activadas se realizó un análisis en gel de zimograma como se describe en la Sección 4.4.5. Se separaron 10  $\mu$ L de la muestra de proteína activa en SDS-PAGE 10% suplementado con gelatina 0.5% bajo condiciones no desnaturalizantes (sin calentar la muestra y sin utilizar agentes reductores como el  $\beta$ -mercaptoetanol). Después de la separación, el gel se incubó en PBS a 37°C durante 24 h y fue teñido con azul de Coomassie. El análisis de la actividad proteolítica de las JmCP's por zimograma revela dos bandas de aproximadamente 24 y 72 kDa, como se puede observar en la Fig. 15. Las bandas corresponden al tamaño de peso molecular de las bandas identificadas en el gel de purificación de proteína que corresponde a las muestras de la proteína JmCP activa y plegada (Fig. 11 y 13), donde la banda de 24 kDa identifica a la proteína madura y la banda de 72 kDa a un dímero de la proteína madura.



**Fig. 15.** Zimograma SDS-PAGE-gelatina de JmCP producida en *E. coli* BL21. Electroforesis en gel de poliacrilamida 10% (SDS-PAGE) suplementado con 0.5% de gelatina con tinción azul de Coomassie. Carril L) Proteína nativa del látex de *J. mexicana*; Carril M) Marcador de peso; Carril W) Proteína cepa silvestre con el mismo tratamiento; Carril A) Proteína JmCP4 plegada y activada para (a) JmCP4 y (b) JmCP5.

---

La más alta actividad proteolítica observada en los geles de la zimografía pertenece al látex de *J. mexicana*. Las proteínas del látex migraron un poco menos que las CPs recombinantes, esto puede deberse a que en el látex las proteínas están agrupadas en multímeros.

### 5.6 Actividad de las proteasas JmCP4 y JmCP5 sobre un sustrato sintético

La actividad enzimática de las proteasas JmCP recombinantes por la hidrólisis del sustrato sintético D-LBAPNA, seguido de la incubación de 10 min a 37°C, a pH 7.0 y se leyó la absorbancia de la reacción a 405 nm y usando el valor de  $\epsilon$  de 8800 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> del grupo saliente (Sección 4.4.6). En la Tabla 7 se muestran los resultados de la actividad específica de las reacciones con JmCP4 y JmCP5 bajo las condiciones de T y pH mencionadas anteriormente. Un estimado de la producción de la pro-enzima producida en *E. coli* fue de 10 mg de proteína purificada y activa por L de medio de cultivo.

**Tabla 7.** Actividad de las proteasas recombinantes producidas en *E. coli*.

<b>Proteína</b>	<b>Actividad específica (U/mg)</b>
<b>JmCP4</b>	29.84
<b>JmCP5</b>	21.70

<sup>(a)</sup>Una unidad(U) es la cantidad de enzima que hidroliza 1  $\mu$ mol de BAPNA por minuto.

<sup>(b)</sup> La actividad enzimática sobre BAPNA de una preparación de papaína (SIGMA), purificada y cristalizada 2X es de 16-40 U/mg.

---

## 5.7 Discusión

Para el diseño de un sistema de expresión proteasas recombinantes de *J. mexicana* se tomo en cuenta la secuencia de aminoácidos del zimógeno de estas proteasas. La mexicana y la quimiomexicana son sintetizadas, conservadas y secretadas *in vivo* como precursores inactivos (zimógenos), estos son convertidas a su forma activa por remoción propéptido y la proteína madura se pliega adoptando su conformación tridimensional. Por lo tanto, para la expresión de estas enzimas en *E. coli* se consideraron dos construcciones de ADNc que produjeran zimógenos de CPs de *J. mexicana*: una secuencia con péptido señal, propéptido y proteína madura (JmCP4), y una secuencia con propéptido y proteína madura (JmCP5), ambas construcciones utilizadas con la finalidad comparar el rendimiento de producción de una proteasa recombinante. Estudios previos han probado con ambos tipos de construcciones, obteniendo los rendimientos más altos cuando la estructura cuenta con péptido señal (Choi et al. 2004, Choudhury et al., 2009). Nuestros resultados están de acuerdo con la de estos autores.

El diseño y construcción del sistema de expresión se realizó con el vector pET28b. Dicha construcción fue exitosa ya que permitió la expresión de dos proteasas recombinantes JmCP (Fig 8y 9). Otros investigadores han obtenido resultados exitosos con proteasas cisteínicas utilizando el vector pET y al igual que este trabajo utilizaron cepas *E.coli* BL21star (DE3 (Kuhelj et al., 1995). La sobreexpresión fue inducida con IPTG obteniéndose la máxima producción de la enzima recombinante a las 4 h, este resultado está de acuerdo con otros autores que obtienen su máximo de producción entre 3.5 y 6 h (Ahsan et al., 2005; Feijoo, 2011).

Las proteasas JmCP4 y JmCP5 fueron expresadas con éxito en *E. coli* BL21 (DE3), está fue detectada como una proteína de 40 kDa producida a partir de 1 h después de la inducción del cultivo con IPTG pero mostrando mayor acumulación después de 4 h (Fig. 8 y 9). La confirmación de la expresión de las JmCP se realizó por el reconocimiento de anticuerpos anti-mexicana (Fig. 14). El sistema de promotor T7 permitió obtener altos rendimientos de JmCP4 de 10 mg/L de proteína pura y activa producida en *E. coli*.

---

El uso de *E. coli* como sistema de expresión tuvo como ventaja un crecimiento rápido, fácil de manipulación, el medio de cultivo fue relativamente de bajo costo y se pudieron alcanzar concentraciones elevadas de la proteína recombinante en pocas horas después de su inducción. Una de las mayores desventajas de utilizar *E. coli* como sistema de expresión para las CPs de *J. mexicana* fue la formación de cuerpos de inclusión. Varios autores han reportado que la recuperación de una proteína a partir de cuerpos de inclusión con frecuencia resulta en pérdida de actividad de las enzimas e implica mayores costos de bioseparación (Kopitar et al., 1996; Tobbel et al., 2002; Lillie et al., 1998).

En este estudio se probaron dos protocolos para la purificación de las proteínas JmCP: condiciones desnaturizantes para la obtención de proteasas insolubles y condiciones nativas para la elución de proteasas solubles. En las Fig. 10, 11, 12 y 13, se observan la elución de las proteínas con cola de His. En el análisis de electroforesis de los lisados bacterianos se encontró que las proteínas recombinantes estuvieron presentes principalmente en la fracción insoluble. La fracción insoluble correspondió a los cuerpos de inclusión en proporción 10:1 con respecto a la fracción soluble.

En condiciones desnaturizantes (Fig. 10 y 12) el peso molecular de la enzima insoluble purificada fue de aproximadamente 40 kDa, además se pueden observar múltiples bandas que no corresponden a las proteínas de interés, esto puede deberse a que varios enlaces que estabilizan la estructura terciaria de la proteína son rotos en condiciones insolubles, y puede ser que algunas proteínas estén atrapadas o interaccionando con otras proteínas durante el proceso de purificación. Utilizando condiciones desnaturizantes se obtuvieron altos rendimientos, sin embargo no fue posible activar la enzima (datos no mostrados), por lo cual se utilizaron condiciones nativas para la purificación de JmCP (Fig. 11 y 13). Aunque mientras se mantuvieron controlados los parámetros relacionados con el plegamiento (pH, temperatura y agentes desnaturizantes), posiblemente la falta de actividad de la proteína JmCP4 y JmCP5 pudo deberse a la falta de un adecuado par redox en el buffer de plegamiento. Se ha reportado que un factor que afecta el rendimiento de una enzima activa es la agregación de proteínas desnaturizadas por los buffers de plegamiento, ya que la



---

exposición de centros hidrofóbicos de cuerpos de inclusión desnaturalizados seguidos de la agregación durante el proceso de repliegamiento puede ser la razón de bajos rendimientos de proteínas recombinantes (Vuillard et al., 1998; Gu, et al 2001). Mientras que el repliegamiento de proteínas *in vivo* es rápido y asistido por moléculas catalíticas, como es el caso de la disulfuro isomerasa o de las chaperonas las cuales inhiben el mal plegamiento y la agregación (Woycechowsky y Raines, 2000); *in vitro* cuando se trata de proteínas que contienen puentes disulfuro esto resulta difícil, y usualmente se obtienen bajos rendimientos que pueden ser debidos a la inapropiada formación de cuerpos disulfuro, agregación e inestabilidad de intermediarios y productos (Goldberg et al., 1991; De Bernardez et al., 1999; Raman et al., 1996). Una alternativa para las metodologías de repliegamiento de proteínas con bajo rendimientos como dilución, diálisis y cromatografía (dilución usada en este caso), en últimos años se ha reportado el uso de otras metodologías que implican el uso de chaperonas para la activación de proteínas, por ejemplo, De et al., (2008) demostraron que el uso de chaperonas dentro de las células hospederas permite el repliegamiento de proteasas desnaturalizadas como la quimotripsina, lisozima y papaína, puede ser posible que el uso de estas metodologías permita mayores rendimientos para futuros estudios de repliegamiento de las proteasas JmCP

En la purificación de JmCP bajo condiciones nativas (Fig. 11 y 13) se detectó la presencia de monómeros de aproximadamente 24 kDa y posibles trímeros de ~72 kDa, la proteína de 24 kDa corresponde al tamaño esperado de la proteína madura de JmCP (siendo el resultado de la autocatálisis que consistió en la separación de las regiones de pro-péptido y péptido señal); mientras la proteína de 72 kDa puede representar la formación de agregados. Ambos valores están dentro del intervalo de masas moleculares de proteasas cisteínicas de plantas (25 a 75 kDa) como lo reporta Duber et al., 2007. Posiblemente las proteasas JmCP4 y JmCP5 pueden ser isoformas del látex de *J. mexicana*, de acuerdo con los resultados mostrados para la quimopapaína de *C. papaya* (Taylor et al., 1999), así como las reportadas en *Vasconcellea stipulata* y *V. X heilbornii* (Kyndt et al., 2007) y *C. candamarcansis* (Corrêa et al., 2011; Texeira et al., 2007). Algunas isoformas de las proteasas de *C. papaya* (Cohen et al., 1990; Baker et al., 1996; Groves et al., 1996; Revell et al., 1993;

---

Taylor et al., 1992; 1995; 1999; Venet et al., 1991) y *C. candamarcensis* (Corrêa et al., 2011) han sido clonadas y expresadas en sistemas heterólogos. El valor de la proteasa recombinante JmCP activa y purificada fue de aproximadamente 10 mg/L.

Las proteasas JmCP4 y JmCP5 purificadas bajo condiciones nativas presentaron actividad enzimática. Las proteínas recombinantes solubles con frecuencia tienen una correcta conformación tridimensional y por lo tanto normalmente son activas (Has y Kim, 2005). El valor de la actividad enzimática entre las proteasas de este estudio con otras proteasas cisteínicas reportadas en la literatura no se pudo comparar debido a que se utilizan diferentes sustratos y condiciones para determinar la actividad específica (Eakin, et al., 1992; Feijoo, 2011). En una preparación comercial de papaína (SIGMA), purificada y cristalizada 2X, se reporta una actividad enzimática sobre BAPNA de 16-40 U/mg (25°C y pH 6.2) (Sigma, EU), estas condiciones son similares a las aquí demostradas y los valores obtenidos con nuestras proteasas recombinantes están dentro de los rangos de esta preparación comercial.

---

## 5.8 Conclusiones

Se logró la producción de dos proteasas recombinantes de *J. mexicana* utilizando a *E. coli* como sistema de expresión. La expresión de las proteasas cisteínicas recombinantes de *J. mexicana* se logró utilizando el sistema de expresión T7 y el vector pET como base para el diseño de los vectores de expresión pET28bJmCP4 y pET28bJmCP5, además estas proteasas contienen una cola de His que permitió una fácil purificación.

La proteína (pre-proteasa) recombinante expresada en *E. coli* fue identificada por su peso molecular (~40 kDa) y su reconocimiento con anticuerpos policlonales de anti-mexicaína. Las proteasas fueron expresadas como cuerpos de inclusión.

La proteína purificada y plegada presentó actividad proteolítica sobre un sustrato sintético (BAPNA) y sobre gelatina (en el zimograma). Los valores de actividad específica fueron comparables con una preparación purificada de papaína comercial.

---

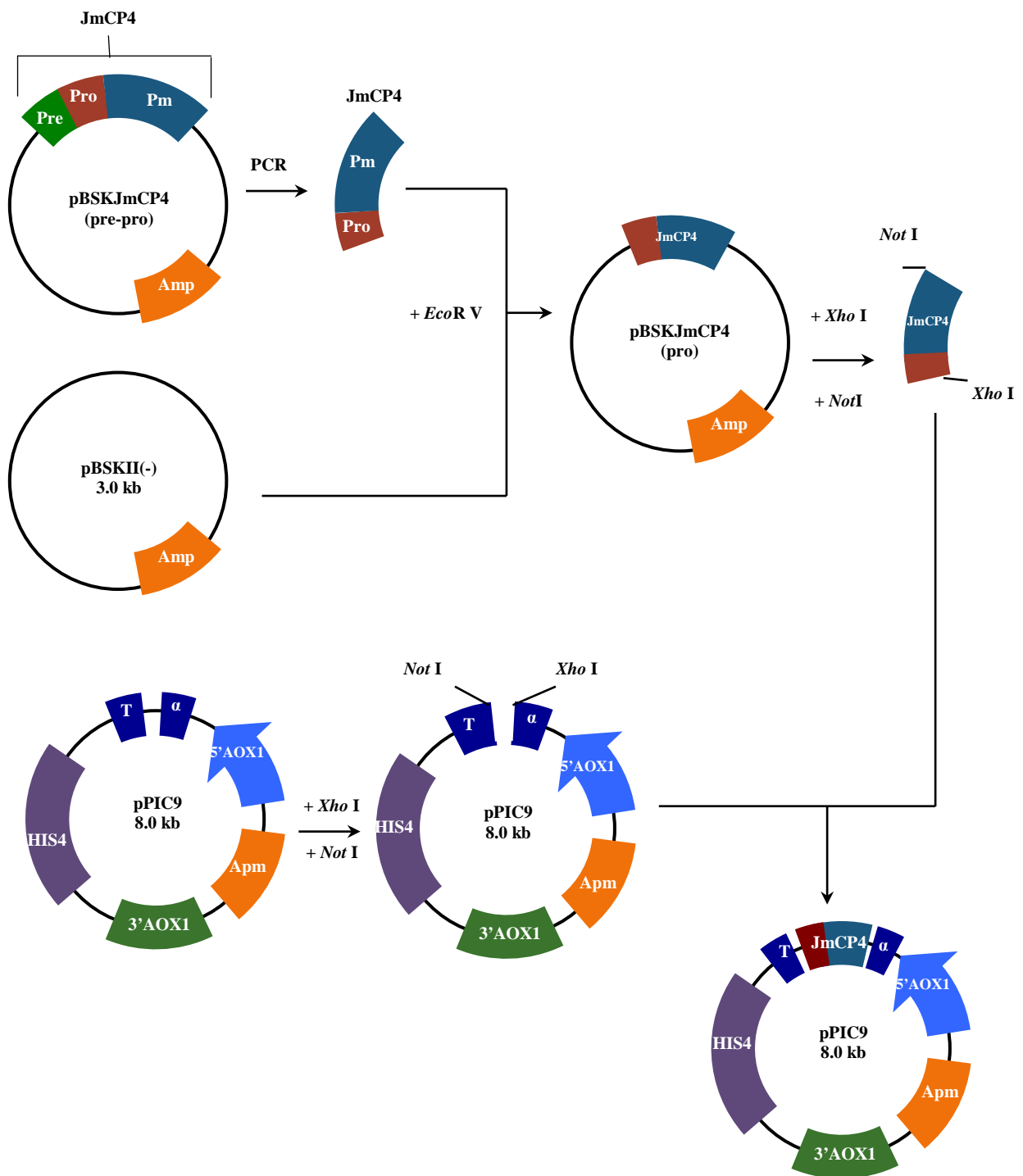
## 6. Expresión de JmCP en *P. pastoris*

Para la expresión del gen JmCP en *P. pastoris* fueron necesarios básicamente tres pasos: la construcción del vector de expresión, la introducción del vector de expresión dentro del genoma de *P. pastoris*, y la evaluación de las cepas de potencial expresión para el producto del gen foráneo.

### 6.1 Construcción de pPIC9JmCP para la transformación de *P. pastoris*

Para la construcción del vector de expresión, fueron agregados los sitios *NotI* y *XhoI* en los extremos de los genes de JmCP por amplificación con PCR utilizando los iniciadores descritos en la Tabla 5. Como se observa en la Fig. 16, la construcción del vector de expresión para JmCP4 consistió en eliminar la región de péptido señal y adicionando los sitios de corte *Xho I* y *Not I* junto con la reconstrucción de las bases que forman parte del sitio de corte de la proteína excretada y localizadas en seguida del sitio *Xho I*. En el caso de JmCP5 se conservó la estructura propéptido y se adicionaron los sitios de corte *Xho I* y *Not I*. La secuencia de ADNc resultante fue clonada en el sitio múltiple de clonación de pPIC9 en los sitios *NotI* y *XhoI* flanqueada por las secuencias del promotor AOX1 y la secuencia del péptido de secreción factor alfa. Las células de *E. coli* DH5 $\alpha$  fueron transformadas con la construcción pPIC9JmCP (Sección 4.1.8) y el plásmido fue recuperado utilizando el método de la Sección 4.3.2.

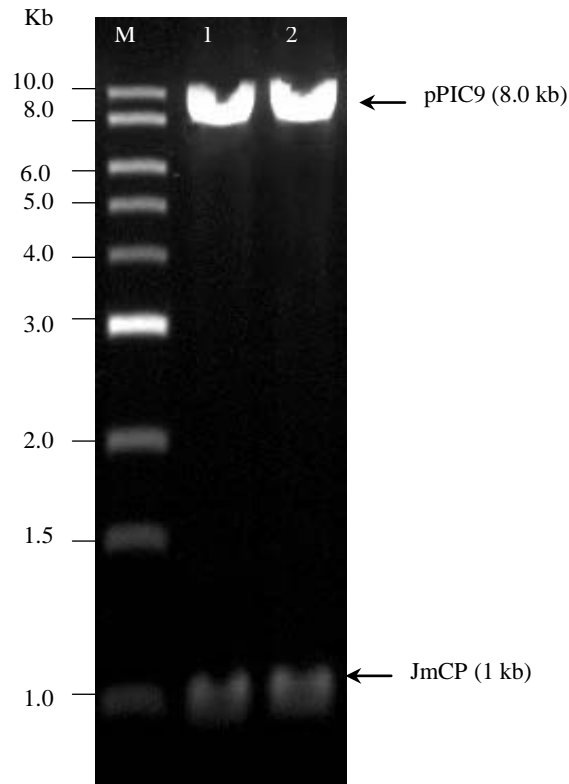
Para confirmar la construcción correcta del vector pPIC9JmCP se realizó la digestión enzimática con las enzimas de restricción *Xho I* y *Not I*. En el análisis por digestión enzimática de los plásmidos pPIC9JmCP4 y pPIC9JmCP5, se muestran dos bandas de la reacción de restricción (Fig. 17), una banda que corresponde al vector pPIC9 de aproximadamente 8.0 kb, y otra banda que corresponde a cada gen de la proteasa de JmCP de 1 kb, confirmando la construcción del vector pPIC9JmCP4 y pPIC9JmCP5.



**Fig. 16.** Representación esquemática de la construcción del vector de expresión pPIC9JmCP4. El ADNc de JmCP4 fue amplificado por PCR, clonado en el vector PBSKII, recuperado con *Xho I* y *Not I* para en seguida ser clonado en pPIC9, previamente digerido con estas mismas enzimas.

---

La construcción de los vectores de expresión pPIC9JmCP, así como la presencia del gen se comprobó mediante secuenciación, como se describe en la sección 4.3.6. Los resultados de secuenciación fueron comparados con las secuencias de JmCP4 y JmCP5, mostrando identidad de los nucleótidos de los genes para la proteína de *J. mexicana*.



**Fig. 17.** Electroforesis en gel de agarosa de la digestión de pPIC9JmCP4 y pPIC9JmCP5. Reacciones de digestión con *XhoI* y *NotI* de los vectores pPIC9bJmCP4 y pPIC9bJmCP5 separadas por electroforesis en gel de agarosa 1%. Carril M) Marcador de peso; Carril 1) pPIC9bJmCP4 digerido con *XhoI* y *NotI*; Carril 2) pPIC9bJmCP5 digerido con *XhoI* y *NotI*.

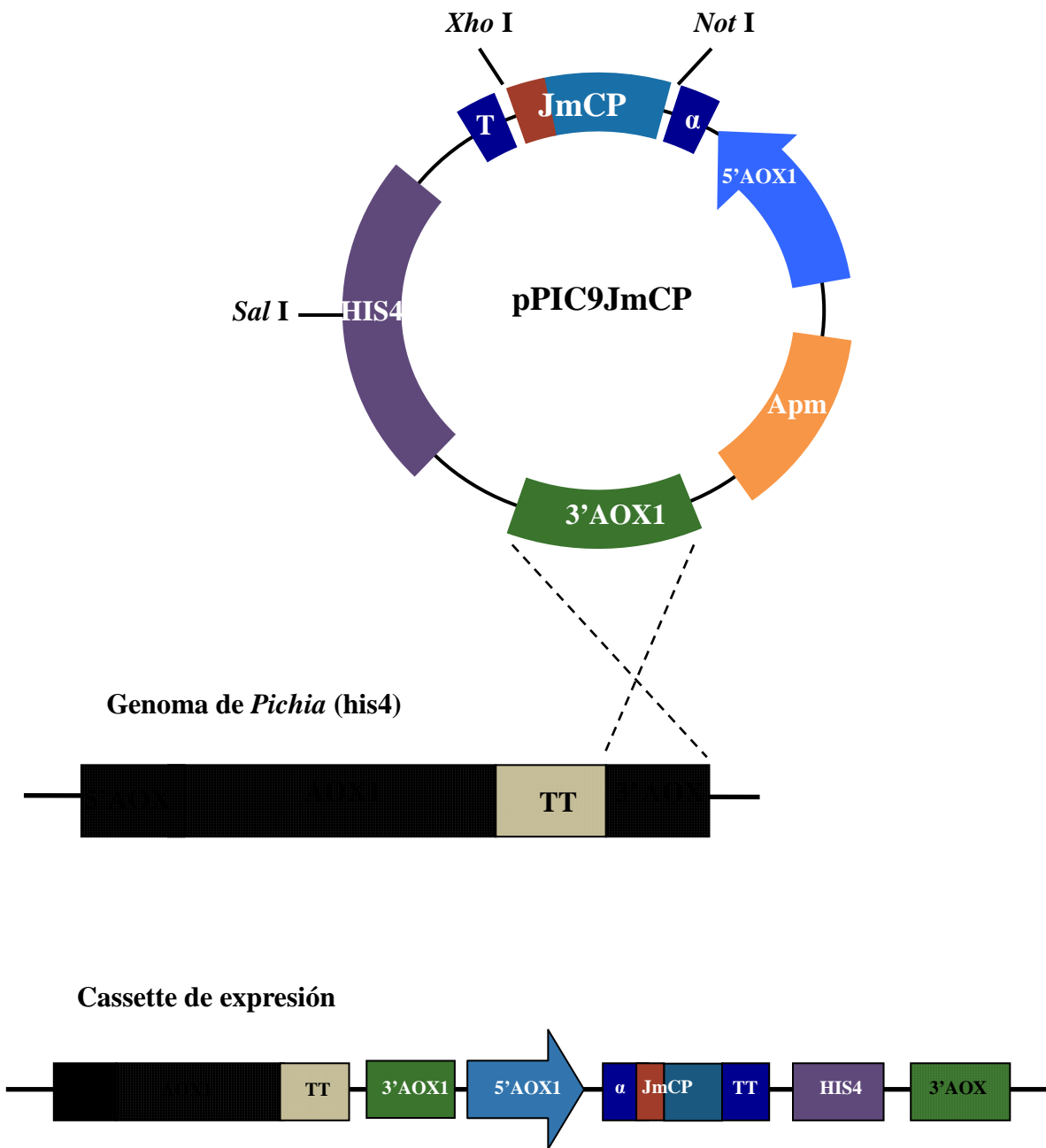
---

## 6.2 Evaluación de la integración de JmCP en el genoma de *P. pastoris*

Para lograr la expresión de JmCP en el sistema eucarionte *P. pastoris*, se transformaron por electroporación las cepas de *Pichia pastoris* GS115 y KM71, como se describe en la sección 4.2.10. Para la transformación fue necesario la linealización del plásmido pPICJmCP con la enzima *SalI* para permitir la integración en el ADN genómico total de la levadura. En la expresión de una proteína recombinante el gen de interés fue ligado a una secuencia señal en el vector pPIC9 (prepro-factor  $\alpha$  para *P. pastoris*) en el sitio al codón que codifica para el primer aminoácido de la pro-región. El sitio de inserción de las secuencias JmCP permitieron regular la expresión de la proteína codificada por el inserto y facilitaron la recombinación homóloga con el locus genómico AOX1 (Fig. 18).

El plásmido de integración facilitó la óptima expresión de los promotores AOX1 dirigidos por la secuencia señal alfa (Fig. 18). La enzima *SalI* fue utilizada por poseer un sitio único de corte en el vector pPIC9, y lo más importante, no contar con un sitio de restricción en las secuencias JmCP.

El análisis de crecimiento de cepas transformadas en placas RDB y RDBH permitió identificar a posibles cepas transformadas. Las cepas silvestres GS115 y KM71 sin transformar tienen una mutación en el gen de la histidinol deshidrogenasa (*his4*) que les impidió la síntesis de histidina y por lo tanto no crecieron en un medio deficiente de histidina. Mientras que las cepas transformadas con el plásmido pPIC9, que lleva el gen de *HIS4*, complementa el gen *his4* de las células de *P. pastoris*, y así las células transformadas y se seleccionaron por su habilidad de crecer en un medio sin histidina. Las colonias que se seleccionaron para analizar la integración de JmCP en su genoma fueron las que crecieron en medio RDB (sin histidina) después de 4 días de incubación a 30°C, y posteriormente se realizó el análisis de la integración del gen por PCR.



**Fig. 18.** Representación esquemática de la integración del vector pPIC9JmCP4 en el genoma de *P. pastoris*.

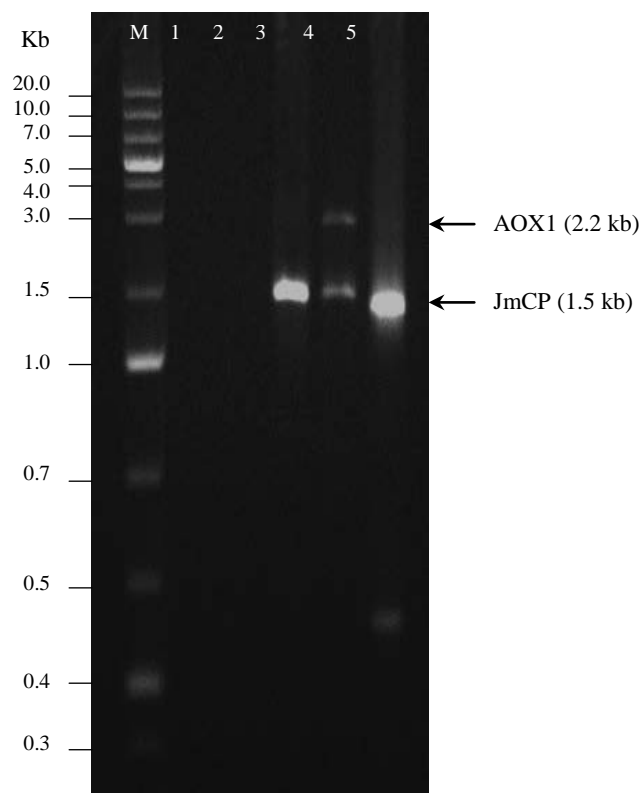


---

Para confirmar la integración del gen JmCP en el genoma, se realizó análisis por PCR del ADN total de las levaduras utilizando los iniciadores 5'AOX y 3'AOX. Las clonas transformadas obtenidas de *P. pastoris* GS115 y KM71 fueron de 3-5 colonias por placa. Con la linealización *SalI* del vector pPIC9JmCP, se esperaba un solo evento de integración por entrecruzamiento sencillo para tomar lugar en el locus cromosomal *his4*, así como también se esperaba el fenotipo His<sup>+</sup>Mut<sup>+</sup> de las cepas transformadas que contenían para ser el gen AOX intacto y funcional.

En el análisis de ADN aislado de varias cepas GS115-JmCP y KM71-JmCP por PCR, mostró que solo se obtuvieron colonias transformadas con el gen JmCP con la cepa GS115. Las cepas transformadas se identificaron por electroforesis en gel de agarosa donde se identificaron por una banda de ~1.5 kb que corresponde a la adición de 1 kb del gen CP y 500 pb correspondientes a la carga del vector pPIC9 (Fig. 19). La presencia de dos bandas indicaron el fenotipo Mut<sup>+</sup>, ya que una segunda banda de ~2.2 kb correspondía al gen AOX; mientras que la presencia de una sola banda indicó que se trataba de una cepa Mut<sup>s</sup>. Además para la confirmación del fenotipo las colonias transformadas por crecimiento en placas MD y MM, y se corroboró que las colonias GS115-JmCP presentaron una banda en el análisis de PCR fueron cepas de bajo consumo de metanol, comprobado por su lento crecimiento en el medio MM.

La integración de JmCP4 en el genoma de *P. pastoris* GS115, así como la presencia de la señal de secreción y de corte, se corroboró por análisis por secuenciación de las muestras obtenidas de las bandas ADN aislado del gel de agarosa. Para el caso del gen JmCP4 fue posible corroborar en el análisis de secuenciación la integración de la construcción deseada. En el caso de JmCP5 no fue posible corroborar la integración por secuenciación, a partir de este punto se continuó el estudio de expresión solo con el gen JmCP4.

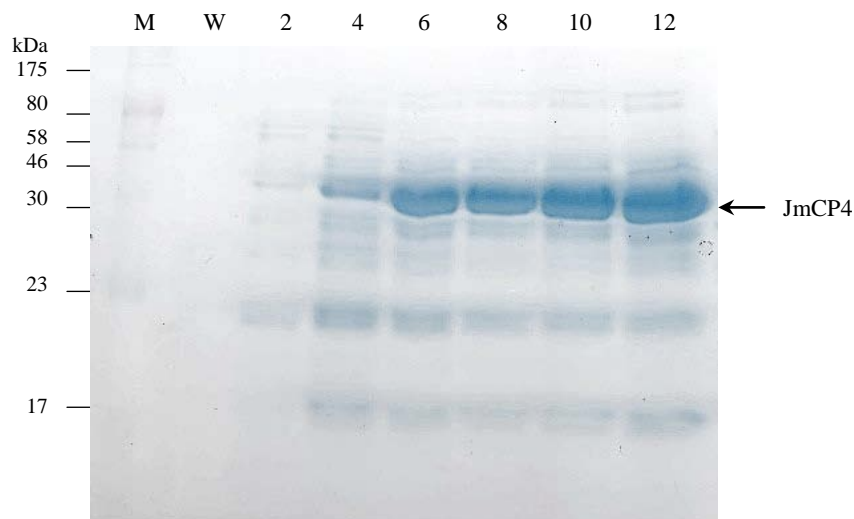


**Fig. 19.** Análisis por PCR de cepas *Pichia* transformadas con pPIC9JmCP. M) Marcador de masa molecular. Carril 1) *P. pastoris*GS115 silvestre; Carril 2) *P. pastoris*GS115 sin el gen JmCP4; Carril 3) *P. pastoris*GS115 transformada con JmCP4 Mut<sup>s</sup>; Carril 4) GS115 transformada con JmCP5 Mut<sup>+</sup>; Carril 5) Control positivo pPIC9JmCP4.

### 6.3 Expresión de JmCP4 en *P. pastoris*

La expresión de JmCP4 en *P. pastoris*GS115, transformada con el vector pPIC9JmCP, fue inducida por adición de metanol 1% en un cultivo de levaduras en fase log (Sección 4.2.14). Para monitorear la expresión de JmCP el cultivo se mantuvo 12 días con inducción de metanol cada 24 h y se tomó 1 mL de muestra a intervalos de 24 h y la muestra fue tratada de acuerdo al protocolo 4.1.16. El sobrenadante del medio de cultivo fue utilizado para análisis de proteína por SDS-PAGE. En la Fig. 20 se muestran un incremento en la intensidad de una banda teñida con Coomassie aparentemente de 36 kDa en muestras tomadas después de 6 a 12 días en cultivo. Los cultivos de las muestras de *P. pastoris* GS115

transformadas con JmCP4, fueron colectadas cada 24 h (desde 6 hasta 12 días) y analizadas por SDS-PAGE. En la Fig. 20 se observa que el tiempo óptimo de expresión para el gen JmCP fue de 6 días, con inducción constante cada 24 h. Del total de la proteína presente en el medio de cultivo, la pro-enzima JmCP representa un alto porcentaje del total de la proteína. Las bandas de menor tamaño molecular pueden corresponder a una proteólisis de la misma proteínasa o debido a otras proteasas nativas de *P. pastoris* ya que el medio no se le adicionó inhibidores de proteasas. La proteína sobreexpresada JmCP no fue observada en células *P. pastoris* GS115 no transformadas (W), siendo que las proteínas que se visualizan en esta muestra son mínimas o nulas, por lo anterior se evidenció una clara presencia de una proteína extracelular producida por la cepa *P. pastoris* transformada con JmCP4. La expresión constante de la pro-proteasa hasta el sexto día puede deberse a que el fenotipo de la cepa utilizada en la fermentación es Mut<sup>s</sup> y por lo tanto requirió de más días para estimular la producción de la proteasa.

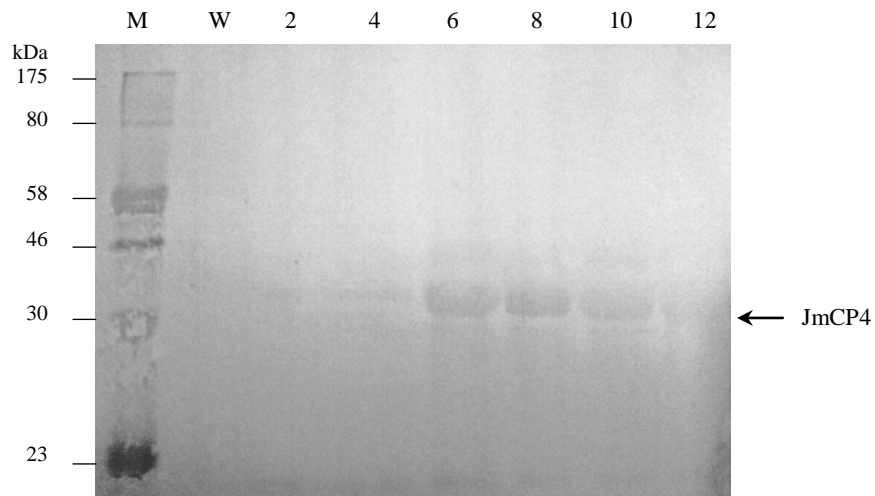


**Fig. 20.** Expresión de la proteína recombinante JmCP4 en *P. pastoris* GS115. Electroforesis en gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE) a 90 mV por 2.5 h. Carril M) Marcador de peso; Carril 1) Proteína extracelular de la cepa silvestre GS115 tomada a los 12 días en cultivo; Carriles d2-d12) proteína extracelular de la cepa de *P. pastoris* GS115 transformada con pPIC9JmCP4 tomada a los 2, 4, 6, 8, 10 y 12 en cultivo.

---

#### 6.4 Identificación inmunoenzimática de la proteína JmCP4

Para verificar la expresión de JmCP en *P. pastoris*, la proteína extracelular fue recuperada y concentrada del medio de cultivo por medio de ultrafiltración y analizada por electroforesis. Posteriormente estas enzimas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa y se realizó la inmunodetección, con anticuerpos policlonales contra mexicanaína. Como se puede observar en la Fig. 21, los anticuerpos anti-mexicanaína reconocieron a una proteína de 36 kDa, lo cual corresponde a la pro-enzima que se observó en el gel de la Fig.20. Los anticuerpos policlonales de anti-mexicanaína no reconocieron a las proteínas de *P. pastoris*GS115 no transformada, así como tampoco se tuvo identificación en la proteína extracelular producida en el segundo y cuarto día de cultivo. A partir del sexto día las proteasas recombinantes son reconocidas por el anticuerpo, lo cual apoya que la expresión de dicha proteína fue exitosa a partir del sexto día de cultivo.

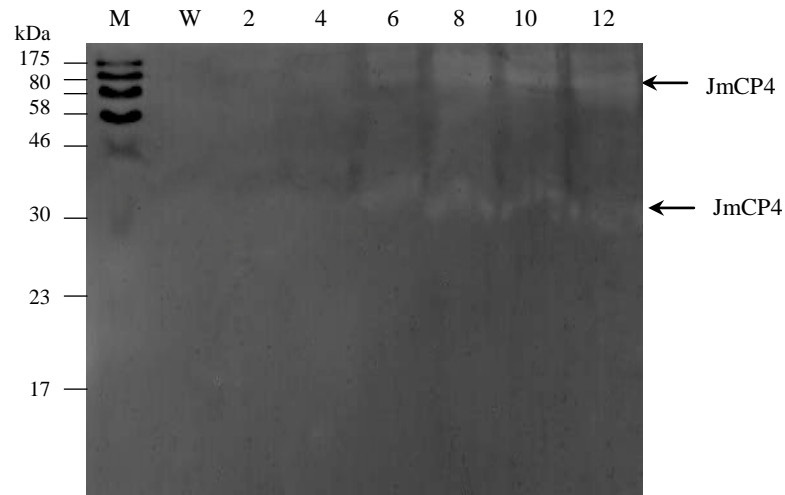


**Fig. 21.** Western blot de JmCP4 producida en *P. pastoris* GS115. Veinte microlitros de las muestras analizadas en gel teñido con azul de Coomassie, fueron separadas por SDS-PAGE 12% y electrotransferidas a una membrana de nitrocelulosa. Carril M) Marcador de peso; Carril W) *P. pastoris*GS115 sin transformar; Carriles 2-12) *P. pastoris*GS115 después de 2, 4, 6, 8, 10 y 12 días con inducción de metanol cada 24 h.

---

## 6.5 Análisis de la actividad proteolítica por zimografía

Para determinar la actividad proteolítica de la pro-enzima JmCP4 se realizó pruebas por zimograma. Para realizar el ensayo de actividad se utilizó el protocolo de la sección 4.4.5, la separación por electroforesis de las proteínas extracelulares en gel de poliacrilamida el cual contenía 0.5% de gelatina y sin agentes reductores, el gel se incubó en PBS a 37°C durante 24 h y fue teñido con azul de Coomassie. El zimograma reveló dos bandas de aproximadamente 36 y 72 kDa, Fig. 22. La banda de 36 kDa corresponde a la proteína madura JmCP4, y la banda de 72 kDa puede corresponder a un dímero de la misma proteína. La muestra de la cepa sin transformar no mostraron la actividad proteolítica.



**Fig. 22. Zimograma SDS-PAGE-gelatina de JmCP4 producida en *P. pastoris* GS115.** Electroforesis en gel de poliacrilamida 10% (SDS-PAGE) suplementado con 0.5% de gelatina con tinción azul de Coomassie. Carril M) Marcador de peso; Carril W) Proteína extracelular de *P. pastoris* GS115 sin transformar; Carriles d2-d12) Proteína extracelular JmCP4 a los días 2, 4, 6, 8 y 10 con inducción de metanol 1% cada 24 h.

---

## 6.6 Actividad de la proteasa JmCP4 sobre un sustrato sintético

Para determinar la actividad de JmCP sobre BAPNA se siguió el protocolo de la Sección 4.4.5, la actividad es mencionada en la tabla 8.

Un estimado de la producción de la pro-enzima producida en *P. pastoris* fue de 23 mg/L de proteína activa en el medio.

**Tabla 8.** Actividad de la proteasa recombinante producida en *P. pastoris*

<b>Proteína</b>	<b>Actividad específica(U/mg)</b>
<b>JmCP4</b>	91.94

<sup>(a)</sup>Una unidad(U) es la cantidad de enzima que hidroliza 1  $\mu$ mol de BAPNA por minuto.

<sup>(b)</sup>La actividad enzimática sobre BAPNA de una preparación de papaína (SIGMA), purificada y cristalizada 2X es de 16-40 U/mg.

---

## 6.7 Discusión

En el presente estudio el gen JmCP de *J. mexicana* fue clonado y expresado de forma heteróloga en *P. pastoris*. El gen fue expresado con las regiones pro-péptido y proteína madura para ser producido como zimógeno e impedir su auto degradación en el medio de cultivo de *P. pastoris*. Resultados similares se obtuvieron en la expresión de proteasas cisteínicas de plantas en forma de zimógeno (Ramjee et al., (1993), Vernet et al., (1995), y Dufour et al., (1998).

La enzima recombinante fue parcialmente caracterizada SDS-PAGE, Western blot y zimograma. Se ha mostrado que la proteína recombinante tiene la capacidad de remover el pro-péptido preferentemente a pH neutral, y así mostrar propiedades similares a una proteasa cisteínica de *J. mexicana*. El peso molecular identificado para la JmCP en las muestras de cinética de crecimiento de *P. pastoris* fue de 36 kDa (Fig. 19) que corresponde al zimógeno JmCP4 con la construcción de propéptido y proteína madura.

La proteína extracelular separada por SDS-PAGE de las transformantes de *P. pastoris* mostraron alrededor de un aumento de la intensidad de la banda de 36 kDa comparado con la proteína extracelular de cepas *P. pastoris* silvestres, después de 2 días de incubación en medio de metanol. Una banda que muestra actividad enzimática fue detectada en las cepas transformadas, esta actividad no se detectó en el sobrenadante de cepas *P. pastoris* no transformadas. El peso molecular de la enzima recombinante fue estimada en 36 kDa (pro-péptido y proteína madura).

El sistema de expresión de *P. pastoris* es bien conocido por su habilidad de sintetizar proteínas enzimáticamente activas y secretarlas en el medio de cultivo. Con este sistema de expresión, se desarrolló por primera vez una cepa de *P. pastoris* capaz de producir y secretar una proteasa cisteínica de *J. mexicana* (JmCP). La integración del ADNc de JmCP en el genoma de *P. pastoris* y fenotipo Mut<sup>s</sup> fue confirmado por análisis de PCR. La cepa de *P. pastoris* GS115-JmCP construida en este trabajo produce y secreta una proteasa cisteínica en el medio de cultivo. Otros autores han tenido éxito usando la construcción de

---

una pro-enzima construcción para secretar proteasas cisteínicas recombinantes producidas en *P. pastoris*, como lo describe Vernet et al., 1995. Las integraciones específicas en el locus AOX1 provocan un fenotipo Mut<sup>s</sup> (crecimiento lento en metanol) y por lo tanto fueron colonias dependientes de la regulación del locus AOX2, mientras que la integración en otro loci provocan fenotipo Mut<sup>+</sup> (rápido crecimiento en metanol) debido a un locus AOX1 más activo (Brömme, 2004).

La producción de JmCP en *P. pastoris* fue confirmada por la identificación de la banda de 36 kDa detectada en SDS- PAGE en el medio de cultivo libre de células. En el cultivo de BMM no se detectó una banda que identificara a la proteína JmCP, este medio de cultivo se utilizó como procedimiento recomendado para producir proteínas recombinantes en matraces, sin embargo, el crecimiento en BMM mostró baja densidad celular. Por esta razón, se probaron diferentes medios de cultivo, ya que algunos estudios han demostrado que la alimentación de metanol y una fuente diferente de carbono en lugar solo de metanol como única fuente de carbono ha demostrado mejorar las productividades de las proteínas recombinantes y alivia la carga metabólica derivada de la producción de proteínas (Jordà et al. 2012). Los cultivos probados fueron un medio de metanol suplementado con sorbitol, otro con alanina y uno más con extracto de levadura. El sorbitol ha sido usado exitosamente en el crecimiento y biogénesis de peroxisomas por defecto de mutantes de *P. pastoris*; mientras que la alanina ha sido utilizada como suplemento en el medio para controlar el pH del medio. Solo el cultivo con sorbitol y el medio de BMGY con extracto de levadura fuente de carbono, lograron altas densidades celulares, esto incrementó la concentración de la proteína heteróloga en el medio de cultivo libre de células, y fue posible visualizar en el SDS-PAGE bandas de 36 kDa. El cultivo en medio BMGY se mantuvo durante 12 días a pH 8.0 asegurando la no degradación de la proteasa. Aunque está cercano al peso molecular de una proteínasa madura de *J. mexicana* (24 kDa) y fue posible detectar con un anticuerpo específico anti-mexicana, se concluye que el producto de expresión fue un pro-enzima y no una proteína madura.

El valor de la actividad enzimática de JmCP producida en *P. pastoris* entre las proteasas de este estudio y otras proteasas cisteínicas reportadas en la literatura no se pudo comparar



---

debido a que se utilizan diferentes sustratos y condiciones. De acuerdo a datos reportados en una preparación comercial de papaína (SIGMA), purificada y cristalizada, se reporta una actividad enzimática sobre BAPNA de 16-40  $\mu\text{mol}/\text{min}$  (25°C y pH 6.2) (Sigma, EU), estas condiciones son similares a las aquí demostradas y los valores obtenidos con nuestras proteasas recombinantes están dentro de los rangos de esta preparación comercial.

La concentración de proteína y la actividad específica de la proteína JmCP producida en *P. pastoris* fue mayor que la proteína producida en *E. coli* (aproximadamente 2 veces mayor), posiblemente debido a la pérdida de proteína en el proceso de purificación cuando se produjo en el sistema procarionte. La principal ventaja de la producción en *P. pastoris* es que la proteasa es extracelular lo que facilitó su purificación.

---

## 6.8 Conclusiones

Se realizó el diseño y construcción del vector para la producción una enzima recombinante en *P. pastoris*.

La inserción y expresión del gen JmCP de *J. mexicana* en el genoma de *P. pastoris* fue confirmado por amplificación el ADN total de *P. pastoris* con PCR y secuenciación demostrando la correcta integración de JmCP4

Por primera vez una logró la producción de una proteasa recombinante de *J mexicana* en *P. pastoris*.

La proteasa recombinante de *P. pastoris* fue identificada por anticuerpos policlonales de anti-mexicana.

La proteasa recombinante producida en *P. pastoris* presentó actividad proteolítica sobre gelatina y sobre un sustrato un sintético. La actividad específica fue aprox. 3 veces mayor a la de papaína purificada y cristalizada 2X (preparación comercial).

---

## 7. Perspectivas

Purificar y cristalizar las proteasas recombinantes JmCP4 y JmCP5.

Analizar otras propiedades terapéuticas de estas enzimas (como actividad mitogénica y angiogénica).

Cinética enzimática de las proteasas de JmCP4 y JmCP5.

Estudio cinético y escalamiento de los cultivos de la proteasas recombinantes.

Estudios de estabilidad a la temperatura y pH.

Identificar otras isoformas de estas proteasas.

---

## 8. Referencias

- Ahsan, N., Aoki, H., Watabw, S. (2005). Overexpression in *Escherichia coli* and functional reconstitution of anchovy trypsinogen from the bacterial inclusion body. *Mol. Biol.*, 30: 193-205
- Antão, C., Malcata, F. (2005). Plant serine proteases: biochemical, physiological and molecular features. *Plant Physiol. Biochem.*,43:637-650
- Arriaga, S., Acosta, J., Pérez, A., León, A., Barba, A. (2010). Coupling aerobic biodegradation of methanol vapors with heterologous protein expression of endochitinase Ech42 from *trichoderma atroviride* in *Pichia pastoris*. *Bioresourse Technol.*, 101: 1661-9665
- Arribere, M., Cortadi, A., Gattuso, M., Bettiol, M., Priolo, N., Caffini, N. (1998). Comparison of Asclepiadaceae latex proteases and characterization of *Morrenia brachystephana* Griseb, cysteine peptidases. *Phytochem. Anal.*,9: 267-273
- Asif, M., Kim, K., Gyu, Y. (2006). Purification and characterization of a serine protease from *Cucumis trigonus* Roxburghi. *Phytochem.*, 67: 870-875
- Baker, K., Taylor, M., Cummings, N., Tuñón, M., Worboys, K., Connerton, I. (1996). Autocatalytic processing of pro-papaya proteinase IV is prevented by crowding of the active-site cleft. *Protein Eng.*, 9: 525-529
- Barret, A. Rawlings, N. (2005). Evolutionary lines of cysteine peptidases. *Biol. Chem.*,382: 727-733
- Barret, A., Buttle, D. (1985). Names and numbers of papaya proteinases. *Biochem. J.*,258: 527
- Berquin, I. Sloane, B. (1994). Cysteine proteases and tumor progression. *Drug Discovery Design*,2: 371-388
- Beyene, G., Foyer, C., Kunert, K. (2006). Two new cysteine proteinases with specific expression patterns in mature and senescent tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) leaves. *J. Exp. Bot.*,57: 1431-1432
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Ann. Biochem.*,72: 248-254
- Briones, R., Cruz, M., Cortes, M., Oliver, M., (1994). Preparaciones enzimáticas de interes industrial. *Inf. Tecnologica*,5: 29-38
- Brömme, D., Nallaseth, F., Turk, B. (2004). Production and activation of recombinant papain-like cysteine proteases. *Method.*, 32: 199-206

- 
- Brooks, D., Tetley, L., Coombs, G., Mottram, J. (2000). Processing and trafficking of cysteine proteases in *Leishmania mexicana*. *J. Cell Sci.*, 113: 4035-4041
- Bryan, P. (2002). Prodomains and protein folding catalysis. *Chem. Rev.*, 102: 4805-4815
- Caffrey, C., Salter, J., Lucas, K., Khiem, D., Hsieh, I., Lim, K., Ruppel, A., McKerrow, J., Sajid, M. (2002). SmCB2, a novel tegumental cathepsin B from adult *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 30: 49-61
- Carmona, E., Dufoir, É., Plouffe, C., Takebe, S., Mason, P., Mort, J., Ménard, R. (1996). Potency and selectivity of the cathepsin L propeptide as an inhibitor of cysteine proteases. *Biochem.*, 35: 8149-8157
- Castañeda, M., Hernández, A., Loeza, F., Salazar, W. (1945). Crystallization of mexicana. *J. Biol. Chem.*, 159: 751
- Cercos, M., Cabonell, J. (1993). Purification and characterization of a thiol-protease induced during senescence of unpollinated ovaries of *Pisum sativum*. *Physiol. Plant*, 88: 267-274
- Cereghino, J., Cregg, J. (2000). Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol. Rev.*, 24: 45-66
- Cervantes, E., Rodriguez, A., Nicolas, G. (1994). Ethylene regulates the expression of a cysteine proteinase gene during germination of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Plant Mol. Biol.*, 25: 207-215
- Chen, J., Dando, P., Stevens, R., Fortunato, M., Barret, A. (1998). Cloning and expression of mouse legumain, a lysosomal endopeptidase. *Biochem. J.*, 335: 11-117
- Chen, C., Wu, P., Huang, C., Cheng, K. (2004). A *Pichia pastoris* fermentation strategy for enhancing the heterologous expression of an *Escherichia coli* phytase. *Enzyme Microbial Technol.*, 35: 315-320
- Chen, H., Huang, D., Hou, W., Liu, J., Lin, Y. (2006). Molecular cloning and characterization of granulin-containing cysteine protease SPCP3 from sweet potato (*Ipomoea batatas*) senescent leaves. *J. Plant Physiol.*, 163: 863-876
- Choi, J., Lee, S., (2004). Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*. *App. Microbiol. Biotechnol.*, 64: 625-635
- Choo, K., Ranganathan, S. (2008). Flanking signal and mature peptide influence signal peptide cleavage. *BMC Bio.*, 9: 1-11
- Choudhury, D., Roy, S. Chakrabarti, C., Biswas, S., Dattagupta, J. (2009). Production and recovery of recombinant propapain with high yield. *Phytochem.*, 70: 465-472

- 
- Cimerman, N., Brguljan, P., Krasovec, M., Suskovic, S., Kos, J. (2001). Serum concentration and circadian profiles of cathepsins B, H and L, and their inhibitors, stefins A and B, in asthma. *Clin. Chim. Acta*, 310: 113-122
- Clark, S., Templeton, M., Sullivan, P. (1997). A secreted aspartic proteinase from *Glomerella cingulata*: purification of the enzyme and molecular cloning of the cDNA. *Microbiol.*, 143: 1395-1403
- Cohen, L., Coghlan, V., Dihel, L. (1986). Cloning and sequencing of papain-encoding cDNA. *Gene*, 48: 219-227
- Cohen, L., Fluharty, C., Dihel, L. (1990). Synthesis of papain in *Escherichia coli*. *Gene*, 88: 263-267
- Corrêa, N., Mendes, I., Gomes, M., Kalapothakis, E., Chagas, B., Lopes, M., Salas, C. (2011). Molecular cloning of a mitogenic proteinase from *Carica candarcensis*: Its potencial use in wound healing. *Phytochem.*, 72:1947-1954
- Cregg, J., Cereghino, J., Shi, J., Higgins, D. (2000). Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Mol. Biotech.*, 16: 23-52
- Curvers, S., Brixius, P., Klauser, T., Thömmes, J., Weuster, D., Takors, R., Wandrey, C. (2001). Human chymotrypsinogen B production with *Pichia pastoris* by integrated development of fermentation and downstream processing. Part 1. Fermentation. *Biotechnol. Prog.*, 17: 495-502
- D'Alessio, K., McQueney, M., Brun, K., Orsini, M., Debouck, C. (1998). Human procathepsin K, an osteoclast-specific protease. *Protein Expr. Purif.* 15: 213-220
- Davis, D., Lanter, K., Makselan, S., Bonati, C., Asbrock, P., Ravishankar, J., Money, N. (2006). Relationship between temperature optima and secreted protease activities of three *Pythium* species and pathogenicity toward plant and animal host. *Mycol. Res.*, 110: 96-103
- De, M., Rotello, V. (2008). Synthetic “chaperones”: nanoparticle-mediated refolding of thermally denatured proteins. *Chem. Comm.*, 14: 3504-3506
- De Bernandez, C., Schwarz, E., Rudolph, R. (1999). Inhibition of aggregation side reactions during *in vitro* protein folding. *Meth. Enzymol.*, 309, 217.
- Del Pozo, O., Lam, E. (1998). Caspases and programmed cell death in the hypersensitive response of plants to pathogens. *Curr. Biol.*, 8: 1129-1132
- Demain, A., Vaishnav, P. (2009). Production of recombinant proteins by microbes and higher organism. *Biotech. And.*, 27: 297-306

- 
- Dolinar, M., Maganja, D., Turk, V. (1995). Expression of full-length human procathepsin L cDNA in *Escherichia coli* and refolding of the expression product. *Biol. Chem. Hoppe Seyler*, 376: 385-388
- Domingos, A., Cardoso, P., Xue, Z., Clemente, A., Brodelius, P., Pais, M. (2000). Purification, cloning and autoproteolytic processing of an aspartic proteinase from *Centaurea calcitrapa*. *Eur. J. Biochem.*, 267: 6824-6831
- Drenth, J., Jansonius, J. Koekoek, R., Swen, H. Wolthers, B. (1968). Structure of papain. *Nature*, 218: 929-932
- Drake, R., John, I., Farrell, A., Cooper, W., Schuch, W, Grierson, D. (1996). Isolation and analysis of cDNAs encoding tomato cysteine proteases expressed during leaf senescence. *Plant Mol. Biol.*, 30: 755-767
- Dubey, V., Pande, S., Singh, B., Jagannadham, M. (2007). Papain-like proteases: applications of their inhibitors. *J. Biotechnol.*, 6: 1077-1086
- Dubois, T., Jacquet, A., Scheneck, A. Looze, Y. (1988). The thiol proteinases from the latex of carica papaya. *Biol. Chem. Hoppe Seyler*, 369: 733-740
- Dufour, E., Tam, W., Nägler, D., Storer, A., Ménard, R. (1998). Synthesis of amidrazones using an engineered papain nitrile hydratase. *FEBS Lett.*, 433: 78-81
- Dussourd, D., Denno, R. (1991). Deactivation of plant defense: correspondence between insect behavior and secretory canal architecture. *Ecology*, 72: 1383-1396
- Dutta, S., Ghost, R., Dattagupta, J., Biswas, S. (2010). Heterologous expression of a thermostable plant cysteine protease in *Escherichia coli* both in soluble and insoluble forms. *Process Biochem.* 45: 1307-1312
- Eakin, A., Mills, A., Harth, G., McKerow, J., Craik, C. (1992). The sequence, organization, and expression of the major cysteine protease (cruzain) from *Trypanosoma cruzi*. *J. Biol. Chem.*, 15: 7411-7420
- Estelle, M. (2001). Proteases and cellular regulation in plants. *Current Opinion Plant Biol.*, 293: 1449-1454
- Farrel, B., Dussourd, D., Mitter, C. (1991). Escalation of plant defense: do latex and resin canals spur plant diversification? *Am. Nat.*, 138: 881-900
- Feijoo, L. Villa, T. (2011). Native and biotechnologically engineered plant proteases with industrial applications. *Food Bioprocess Technol.*, 4:1066-1088

- 
- Forsthoefel, N., Cushman, M., Ostrem, J., Cushman, J. (1998). Induction of a cysteine protease cDNA from *Mesembryanthemum crystallinum* leaves by environmental stress and plant growth regulators. *Plant Sci.*, 136: 195-206
- Gavira, J., González, L., Oliver, M., Soriano, M., García, J. (2007). Structure of the mexicanaína-E-64 complex and comparison with other cysteine proteases of the papain family. *Acta Crystallogr.*, 63: 555-563
- Gellison, G., Janowicz, J., Weydemann, U., Melber, K., Strasser, A., Hollenberg, C. (1992). High-level expression of foreign genes in *Hansenula polymorpha*. *Biotech. Adv.*, 10: 179-189
- Ghost, R., Dattagupta, J., Biswas, S. (2007). A thermostable cysteine protease precursor from a tropical plant contains an unusual C-terminal propeptide: CDA cloning, sequence comparison and molecular modeling studies. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 362: 965-970
- Glick, B. (1995). Metabolic load and heterologous gene expression. *Biotech. Adv.*, 13: 247-261
- Gomes, M., Mello, V., Rodrigues, K., Bemquerer, M., Lopes, M., Faça, V., Salas, C. (2005). Isolation of two plant proteinases in latex from *Carica candamarcensis* acting as mitogens for mammalian cells. *Planta Med.*, 244-248
- Goldberg, M., Rudolph, R., Jaenicke, R., (1991). Kinetic study of the competition between renaturation and aggregation during the refolding of denatured reduced egg white lysozyme. *Biochemistry* 30: 2790
- González, N., Badillo, J., Aranda, J., Oliver, M. (2011). Production of plant proteases *in vivo* and *in vitro* – a review. *Biotech. Adv.*, 29:983-996
- Groves, M., Taylor, M., Scott, M., Cummings, N., Pickersgill, R., Jenkins, J. (1996). The prosequence of procaicain forms an alpha-helical domain that prevents access to the substrate-binding cleft. *Structure*, 4: 1193-1203
- Grudkowska, M., Zagdanska, B. (2004). Multifunctional role of plant cysteine proteinases. *Acta Biochem. Pol.*, 51: 609-624
- Gu, Z., Su, Z., Janson, J. (2001). Urea gradient size-exclusion chromatography enhanced the yield of lysozyme refolding. *J. Chromatogr.*, 918: 311-318
- Hadj, N., Tounsi, H., Chabchoub, A., Abid, N., Gargouri, A. (2011). Studies on the zymogram method for the detection of pectinolytic activities using CTAB. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 165: 1652-1160
- Hans, P., Kim, K. (2005). Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Microb. Cell Fact.*, 4: 1-8



- 
- Hartley, B. (1960). Proteolytic enzymes. *Annu. Rev. Biochem.*, 29: 45-72
- Hou, W., Huang, Y., Lin, Y. (2002). An aspartic type protease degrades trypsin inhibitors, the major root storage proteins of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam cv Tainong 57), *Bot. Bull Acad. Sin.*, 43: 271-276
- Huang, D., Chen, H., Hou, W. (2005). Expression and function of a cysteine proteinase cDNA from sweet potato (*Ipomoea batatas* [L.] Lam 'Tainong 57') storage roots. *Plant Sci.*, 169: 423-431
- Hwang, H., Chung, H. (2002). Preparation of active recombinant cathepsin K expressed in bacteria as inclusion body. *Protein Expr. Purif.* 25: 541-546
- Jones, J., Mullet, J. (1995). Developmental expression of a turgor-responsive that encodes an intrinsic membrane protein. *Plant Mol. Biol.*, 28: 1055-1065
- Jones, M., Chaffin, G., Eason, J., Clark, D. (2005). Ethylene-sensitivity regulates proteolytic activity and cysteine protease gen expression in petunia corollas. *J. Exp. Bot.*, 56: 2733-3744
- Jordà, J., Jouhten, P., Cámara, E., Maaheimo, H., Albiol, J., Ferrer, P. (2012). Metabolic flux profiling of recombinant protein secreting *Pichia pastoris* growing on glucose: methanol mixtures. *Microbiol. Cell Fac.*, 11:57
- Kaminsky, V., Zhivotovsky, B. (2012). Proteases in autophagy. *Proteins Proteom.*, 1824: 44-50
- Kang, H., Sohn, J., Choi, E., Chung, B., Yu, M., Rhee, S. (1998). Glycosylation of human alpha 1-antitrypsin in *Saccharomyces cerevisiae* and methylotrophic yeast. *Yeast*, 14: 371-382
- Koizumi, M., Yamaguchi, K., Tsuji, H., Shinozaki, K. (1993). Structure and expression of two genes that encode distinct drought-inducible cysteine proteinases in *Arabidopsis thaliana*. *Gene*. 129: 175-182
- Komeda, T., Tazumi, K., Shimada, H., Kano, K., Hayashi, T., Tsumura, H., Kato, N., Sakai, Y., Kondo, K. (2002). Production of active bovine cathepsin C (dipeptidyl aminopeptidase I) in the methylotrophic yeast *Candida boidinii*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 59: 252-258
- Konno, K., Hiramaya, C., Nakamura, M., Tateishi, K., Tamura, Y., Hattori, M., Kohno, K. (2004). Papain protects papaya trees from herbivorous insects: role of cysteine proteases in latex. *Plant J.*, 37: 370-378.
- Kopitar, G., Dolinar, M., Srukelj, B., Pungercar, J., Turk, V. (1996). Folding and activation of human procathepsin S from inclusion bodies produced in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.*, 236: 558-562

- 
- Kuhelj, R., Dolinar, M., Pungercar, J., Turk, V. (1995). The perperacition of catalytically active human cathepsin B from its precursor expressed in *Escherichia coli* in the form of inclusion bodies. *Eur. J. Biochem.*, 229: 533-9
- Kyndt, T., Damme, E., Van Beeumen, J., Gheysen, G. (2007). Purification and characterization of the cysteine proteinases in the latex of *Vasconcellea spp.* *FEBS J.*, 274: 451-462
- Laemmli, U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685
- Lecaille, F., Brömme, D. (2002) Human and parasitic papain-like cysteine proteases: their role in physiology and pathology and recent developments in inhibitor design. *Chem. Rev.*, 102: 4459-4488
- Lilie, H., Schwarz, E., Rudolph, R. (1998). Advances in refolding of proteins produced in *E. coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 9: 497-501.
- Lima, A., Reí, F., Serveau, C., Lalmanach, G., Juliano, L., Ménard, R., Vernet, T., Thomas, D., Stored, C., Scharfstein, J. (2001) Cystein protease isoforms from *Trypanosoma cruzi*, cruzipain 2 and cruzain, present different substrate preference and susceptibility to inhibitors. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 114: 41-52
- Linnevers, C., McGrath, M., Armstrong, R., Mistry, F., Barnes, M., Klaus, J., Palmer, J., Katz, B., Bromme, D. (1997). Expression of human cathepsin K in *Pichia pastoris* and preliminary crystallographic studies of an inhibitor complex, *Protein Sci.*, 6: 919-921
- Lohman, K., Gan, S., Manorama, C., Amasino, R. (1994). Molecular analysis of natural leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*, *Physiol. Plant*, 92: 322-328
- Mansur, M., Martínez, L., Pérez, M., Alonso, M., Márquez, I., Proenza, Y., Varas, L., Avilés, F. (2007). Expression, purification and characterization of porcine pancreatic carboxypeptidase B from *Pichia pastoris* for the conversion of recombinant human insulin. *Enzyme Microm. Tech.*, 40: 476-480
- Martínez, E., Herrera, A., Badillo, J., Garibay, C., González, N., Oliver, M. (2012). Isolation of cDNA from *Jacaratia mexicana* encoding a mexicaína-like cysteine protease gene. *Gene*, 502: 60-68
- Mazorra, M., Yada, R., (2008). Expression and characterization of the recombinant aspartic proteinase A1 from *Arabidopsis thaliana*. *Phytochem.* 69: 2439-2448
- Mello, V., Gomes, M., Lemos, F., Delfino, J., Andrade, S., Lopes, M., Salas, C. (2008). The gastric ulcer protective and healing role of cysteine proteinases from *Carica candamarcensis*. *Phytomed.*, 15: 237-244

- 
- McKerrow, J. (1999). Development of cysteine protease inhibitors as chemotherapy for parasitic diseases: insights on safety, target validation, and mechanism of action. *Int. J. Parasitol.*, 29: 833-937
- Muntari, B., Amid, A., Mel, M., Jami M., Salleh, H. (2012). Recombinant bromelain production in *Escherichia coli*: process optimization in shake flask culture by response surface methodology. *AMB Express*. 2: 1-9
- Nägler, D., Zhang, R., Tam, W., Sulea, T. Purisima, E., Ménard, R. (1999). Human cathepsin X: a cysteine proteases with unique carboxypeptidase activity. *Biochem.*,38: 12648-12654
- Oliver, M., González, L., Gavira, J., Soriano, M., García, J. (2004). Purification crystallization and preliminary X-ray analysis of mexicain. *Acta Crystallogr.*, D60: 2058-2060.
- Oliver, M., Lian, Z., Laursen, R., Bolaños, V., Soriano, M. (2011). Biochemical characterization of MX-4, a plant cysteine protease of broad specificity and high stability. *Food Chem.*, 126: 543-552
- Palma, J., Sandalio, L., Corpas, F., Romero, C., McCarthy, I., Río, L. (2002). Plant proteases, protein degradation, and oxidative stress: role of peroxisomes. *Plant Physiol. Biochem.*,40: 521-530
- Payrol, J., Obregón, W., Trejo, S., Caffini, N. (2008). Purification and characterization of four new cysteine endopeptidasas from fruits of *Bromelia penguin* L. grown in Cuba. *Protein J.*,27: 88-96
- Pavlov, A. y Reichert, J. (2004). Recombinant protein therapeutics: sucess rates, marker trends and values to 2010, *Nat. Biotechnol.* 22, 1513-1519
- Pearce, G., Bhattacharya, R., Chen, Y. (2008). Peptide signals for plant defense display a more universal role. *J. Biochem. Chem.*, 3: 1091-1092
- Pechan, T., Jiang, B., Steckeler, D., Lin, L., Luthe, D., Williams, W. (1999). Characterization of three distinct cDNA clones encoding cysteine proteinases from maize. *Plant Mol. Biol.*,40: 111-119
- Peng, S., Zhu, J., Li, H., Tian, W. (2008). Cloning and characterization of a novel cysteine protease gene (HbCP1) from *Hevea brasiliensis*. *J. Bioscience*,33: 681-90
- Pereira, M., Lopes, M., Meira, W., Salas, C. (2001). Purification of cysteine proteinase from *Carica candamarcensis* L. and cloning of a genomic putative fragment coding for this enzyme. *Protein Expres. Purif.*,22: 249-257

- 
- Perpetuo, E., Juliano, L., Lebrun, I. (2003). Biochemical and pharmacological aspects of two bradykinin-potentiating peptidases obtained from tryptic hydrolysis of casein. *J. Protein Chem.*, 22: 601-606
- Potvin, G. Ahmad, A., Zhang, Z. (2010). Bioprocess engineering aspects of heterologous protein in *Pichia pastoris*: a review. *Biochem. Eng. J.* 64: 91-105
- Priolo, N., Morcelle, S., Arribère, M., López, L., Caffini, N. (2000). Isolation and characterization protease from latex of *Araujia hortorum* fruits. *J. Protein Chem.*, 19: 39-49
- Rabiza, J., Rybka, Z., Skutnik, E. Lukaszewska, A. (2003). Proteolysis and expression of the cysteine protease gene in senescing cut leaves of *Hosta* 'Undulate Erromena' and *Zantedeschia aethiopica* Spr. Treated with BA or GA<sub>3</sub>. *Acta Physiolo. Planta*, 25: 319-324
- Ramjee, M., Petithory, J., McElver, J., Weber, S., Kisch, J. (1996). A novel yeast expression/secretion system for the recombinant plant thiol endoprotease propapain. *Protein Eng.*, 9:1055-1061
- Rao, M., Tanksale, M., Ghatge, M., Deshpande, V. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol Mol. Biol. Rev.*, 62: 597-635
- Raman, B., Ramkrishna, T., Rao, C. (1996). Refolding of denatured and denatured/reduced lysozyme at high concentrations. *J. Biol. Chem.*, 271: 17067
- Rawlings, N. Barret, A. (1960). Evolutionary families of peptidases. *Biochem J.*, 290: 205-218
- Revell, D., Baker, K., Collins, M., Taylor, M., Sumner, I., Pickersgill, R., Connerton, I., Goodenought, P. (1993). Nucleotide sequence and expression in *Escherichia coli* for cDNAs encoding papaya proteinase omega from *Carica papaya*. *Gene*, 30: 221-225
- Riese, R., Mitchell, R., Villadangos, J., Shi, G. Palmer, J., Karp, E., Sanctis, G., Ploegh, H., Chapman, H. (1998). Cathepsin S activity regulates antigen presentation and immunity. *J Clin. Invest.*, 101: 2351-2363
- Romero, J., Oliver, M., Castañeda, L., Castillo, M. (1976). Proteinases de plantas mexicanas VI. Efecto del pH, la temperatura y reductores en la estabilidad de la mexicana. *Rev. Latinoamer. Quím.*, 7: 137-141
- Salid, M. McKerrow, J. (2000). Cysteine proteases of parasitic organisms. *Mol. Biochem. Parasito.*, 120: 1-21
- Salas, C., Gomes, M., Hernandez, M., Lopes, M. (2008). Plant cysteine proteinases: evaluation of the pharmacological activity. *Phytochemistry*, 69: 2263-2269
- Sambrook, J. Russell, D. (2001). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor

- 
- Laboratory Press, 31, 33, 37, 38
- Sanderson, S., Pllock, K., Hilley, J., Meldal, M., Hilaire, P., Julianos, M., Julianos, L., Mottram, J., Coombs, G. (2000). Expression and characterization of a recombinant cysteine proteinase of *Leishmania mexicana*. *Biochem. J.*, 347: 383-388
- Santamaria, I., Velasco, G., Pendás, A., Paz, A., López, C. (1998). Molecular cloning and structural and functional characterization of human cathepsin F, a new cysteine proteinase of the papain family with a long propeptide domain. *J. Biol. Chem.*, 274: 13800-13809
- Schutter, K., Lin, Y., Tiels, P., Van-Hecke, A., Glinda, S., Weber, J., Rouzé, P., Van de Peer, Y., Callewaert, N. (2009). Genome sequence of the recombinant protein production host *Pichia pastoris*. *Nat Biotechnol.*, 27: 561-566
- Shi, Y., Cui, L., Yuan, J. (2007). Gene cloning, expression, and substrate specificity of an imidase from the strain *Pseudomonas putida* YZ-26. *Curr. Microbiol.* 55:61-64
- Sinha, J., Bradley, A., Inan, M., Meagher, M. (2005). Causes of proteolytic degradation of secreted recombinant proteins produced in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*: case study with recombinant ovine interferon- $\tau$ . *Biotech. Bioeng.*, 89:102-112
- Silva. S., Malcata, F. (2005a). Partial identification of watersoluble peptides released at early stages of proteolysis in sterilized ovine cheese-like systems: influence of type of coagulant and starter. *J. Dairy Sci.*, 88: 1947-54
- Silva. S., Malcata, F. (2005b). Studies pertaining to coagulant and proteolytic activities of plant proteases from *Cynara cardunculus*. *Food Che.*, 89: 19-26
- Singh, S., Panda, A. (2005). Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *Soc. Biotech.*, 99: 303-310
- Smith, S., Gottesman, M. (1989). Activity and deletion analysis of recombinant cathepsin L expressed in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 264: 20487-20495
- Solís, S., Domínguez, A., Hernández, A. (1993). Cooperativity in the unfolding transitions of cysteine proteinases. Calorimetric study of heat denaturation of chymopapain and papain. *Biochim. Biophys Acta*, 1203: 121-125
- Somoza, J., Palmer, J., Ho, J. (2002) The crystal structure of human cathepsin F and its implications for the development of novel immunomodulators. *J. Mol. Biol.* 322: 559-568
- Studier, F. (1991). Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system. *J. Mol. Biol.*, 5: 37-44
- Swartz, J. (2001). Advances in *Escherichia coli* production of therapeutic proteins. *Curr. Opin.*

- 
- Biotechnol.*, 12: 195-201
- Taylor, M., Pratt, K., Revell, D., Baker, K., Summer, I., Goodenough, P. (1992). Active papain renatures and processed from insoluble recombinant propapain expressed in *Escherichia coli*. *Protein Eng.*,5: 455-459
- Taylor, M., Baker, K., Briggs, G., Connerton, I., Cummings, N., Pratt, K., Revell, D., Freedman, R., Goodenough, P. (1995). Recombinant pro-regions from papain and papaya proteinase IV are selective high affinity inhibitors of mature papaya enzymes. *Protein Eng.*,5: 59-62
- Taylor, M., Al-sheikh, M., Revell, D., Summer, I., Connerton, I. (1999). cDNA cloning and expression of *Carica papaya* prochymopapain isoforms in *Escherichia coli*. *Plant Sci.*,145: 41-47.
- Texeira, R., Ribeiro, H., Gomes, M., Lopes, M., Salas, C. (2008). The proteolytic activities in latex from *Carica candamarcensis*. *Plant Physiol. Biochem.*,46: 956-961
- Tian, R., Zhang, G., Yan, C., Dai, Y. (2000). Involvement of poly (AND-ribose) polymerase and activation of caspase-3-like protease in heat shock-induced apoptosis in tobacco suspension cells. *FEBS Lett.*,474: 11-15
- Tobbell, D., Middleton, B., Raines, S., Needham, M., Taylor, I., Beveridge, J., Abbott, W. (1992). Identification of *in vitro* folding conditions for procathepsin S and cathepsin S using fractional factorial screens. *Protein Expr. Purif.*, 24: 242-254
- Ueda, T., Seo, S., Ohashi, Y., Hashimoto, J. (2000). Circadian and senescence-enhanced expression of a tobacco cysteine protease gene. *Pharm.*, 44: 649-657
- Van der Hoorn, R. (2004). Plant proteases: from phenotypes to molecular mechanisms. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 59: 191-223
- Veenhuis, M., van Dijken, J., Harder, W. (1983). The significance of peroxisomes in the metabolism of one-carbon compounds in yeast. *Adv. Microb. Physiol.*, 24: 1-82
- Velasco, G., Ferrando, A., Puente, X., Sánchez, L. López, C. (1994). Human cathepsin O. Molecular cloning from a breast carcinoma, production of the active enzyme in *Escherichia coli*, and expression analysis in human tissues. *J. Biol. Chem.*, 273: 16816-23
- Ventura, S., Villegas, V., Stener, J., Larson, J., Vendrell, J., Hershberger, C., Avilés, F. (1999). Mapping the pro-region of carboxypeptidase B by protein engineering. Cloning, overexpression, and mutagenesis of porcine proenzyme. *J. Biol. Chem.*, 274: 19925-19933
- Vernet, T., Khouri, H., Laflamme, P., Tessier, D., Musil, R., Gour, B., Stoner, A., Thomas, D.

- 
- (1991). Processing of papain precursor. Purification of the zymogen and characterization of its mechanism of processing. *J. Biol. Chem.*, 266: 21451-21457
- Vernet, T., Berti, P., Montigny, C., Musil, R., Tessier, D., Ménard, R., Magny, M., Storer, A., Thomas, Y. (1995). Processing of the papain precursor. The ionization state of a conserved amino acid motif within the pro region participates in the regulation of intramolecular processing. *J. Biol. Chem.*, 270: 10838-10846
- Vuillard, L., Rabilloud, T., Golberg, M. (1998). Interactions of non-detergent sulfobetaines with early folding intermediates facilitate in vitro protein renaturation. *Eur. J. Biochem.*, 256, 128-135.
- Wagstaff, C., Leverentz, M., Griffiths, G., Thomas, B., Chanasut, U., Stead, A., Rogers, H. (2002). Cysteine protease gene expression and proteolytic activity during senescence of *Alstroemeria petals*. *Ann. Bot.*, 53: 233-240
- Wegner, G. (1990). Emerging applications of the methylotrophic yeast. *FEMS Microbiol.* 7: 279-283
- Woycechowsky, K., Raines, R. (2000). Native disulfide bond formation in proteins. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 4:533
- Yamashita, D., Dodds, R. (2000). Cathepsin K and the design of inhibitors of cathepsin K. *Curr PharmDes.* 6: 1-24
- Yesilirmak, F., Sayers, Z. (2009). Heterologous expression of plant genes. *Int. J. Plant Gen.*, 1-16
- Zeng, F., Zhu, Y., Cohen, A. (2002). Partial characterization of trypsin-like protease and molecular cloning of a trypsin-like precursor cDNA in salivary gland of *Lygus lineolaris*. *Pharm.*, 131: 453-463
- Zhou X., Xiao, A., Zhou, L. Zhang Y. (2006). Improvement of cell viability and hirudin production by ascorbic acid in *Pichia pastoris* fermentation. *App. Microbiol. Biotechnol.* 72:837-844